

# THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

**M. EDMOND VOISENET**

LICENCIÉ ÈS SCIENCES MATHÉMATIQUES ET PHYSIQUES

PHARMACIEN DE 1<sup>re</sup> CLASSE

PRÉPARATEUR DE CHIMIE GÉNÉRALE A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE DIJON

PROFESSEUR SUPPLÉANT, CHARGÉ DE COURS DE PHARMACIE ET DE MATIÈRE MÉDICALE

A L'ÉCOLE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE DIJON

**1<sup>re</sup> THÈSE.** — ÉTUDE DU *BACILLUS AMARACHYLUS*, AGENT  
DE DÉSHYDRATATION DE LA GLYCÉRINE.

**2<sup>me</sup> THÈSE.** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

*Soutenues le 21 Décembre 1917, devant la Commission d'examen.*

MM. G. BERTRAND, *Président.*

LEDUC

PORTIER

} *Examineurs.*

DIJON

IMPRIMERIE R. DE THOREY

5, RUE DOCTEUR-CHAUSSIER, 5

1917













# THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

**M. EDMOND VOISENET**

LICENCIÉ ÈS SCIENCES MATHÉMATIQUES ET PHYSIQUES  
PHARMACIEN DE 1<sup>re</sup> CLASSE

PRÉPARATEUR DE CHIMIE GÉNÉRALE A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE DIJON  
PROFESSEUR SUPPLÉANT, CHARGÉ DE COURS DE PHARMACIE ET DE MATIÈRE MÉDICALE  
A L'ÉCOLE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE DIJON

**1<sup>re</sup> THÈSE.** — ETUDE DU *BACILLUS AMARACRYLUS*, AGENT  
DE DÉSHYDRATATION DE LA GLYCÉRINE.

**2<sup>me</sup> THÈSE.** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.



Soutenues le 21 Décembre 1917, devant la Commission d'examen.

MM. G. BERTRAND, *Président.*

LEDUC }  
PORTIER } *Examineurs..*

DIJON

IMPRIMERIE R. DE THOREY

5, RUE DOCTEUR-CHAUSSIER, 5

1917



# FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

*Doyen* ..... P. ARPEL, *Professeur*. Mécanique analytique et Mécanique céleste.

*Professeur honoraire*. P. PUISEUX.

|                                   |                               |                                              |
|-----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------|
|                                   | LIPPMANN.....                 | Physique                                     |
|                                   | BOUTY.....                    | Physique.                                    |
|                                   | BOUSSINESQ.....               | Physique mathém. et calcul des probabilités. |
|                                   | PICARD.....                   | Analyse supérieure et algèbre supérieure.    |
|                                   | Y. DELAGE.....                | Zoologie, anatomie, physiologie comparée.    |
|                                   | Gaston BONNIER.....           | Botanique.                                   |
|                                   | KOENIGS.....                  | Mécanique physique et expérimentale.         |
|                                   | VÉLAIN.....                   | Géographie physique.                         |
|                                   | GOURSAT.....                  | Calcul différentiel et calcul intégral.      |
|                                   | HALLER.....                   | Chimie organique.                            |
|                                   | JONNNIS.....                  | Chimie (Enseignement P. C. N.)               |
|                                   | JANET.....                    | Physique.                                    |
|                                   | WALLERANT.....                | Minéralogie.                                 |
|                                   | ANDOYER.....                  | Astronomie.                                  |
|                                   | PAINLEVÉ.....                 | Mécanique rationnelle.                       |
|                                   | HAUG.....                     | Géologie.                                    |
|                                   | HOUSSAY.....                  | Zoologie.                                    |
| <i>Professeurs</i> .....          | H. LE CHATELIER.....          | Chimie.                                      |
|                                   | Gabriel BERTRAND.....         | Chimie biologique.                           |
|                                   | M <sup>me</sup> P. CURIE..... | Physique générale.                           |
|                                   | CAULLERY.....                 | Zoologie (Evolution des êtres organisés).    |
|                                   | C. CHABRIÉ.....               | Chimie appliquée.                            |
|                                   | G. URBAIN.....                | Chimie.                                      |
|                                   | Emile BOREL.....              | Théorie des fonctions.                       |
|                                   | MARCHIS.....                  | Aviation.                                    |
|                                   | Jean PERRIN.....              | Chimie physique.                             |
|                                   | G. PRUVOT.....                | Zoologie, anatomie, physiologie comparée.    |
|                                   | MATRUCHOT.....                | Botanique.                                   |
|                                   | ABRAHAM.....                  | Physique.                                    |
|                                   | CARTAN.....                   | Calcul différentiel et calcul intégral.      |
|                                   | CL. GUICHARD.....             | Mathématiques générales.                     |
|                                   | MOLLIARD.....                 | Physiologie végétale.                        |
|                                   | N.....                        | Application de l'analyse à la géométrie.     |
|                                   | N.....                        | Histologie.                                  |
|                                   | N.....                        | Physiologie.                                 |
|                                   | LEDOC.....                    | Physique.                                    |
|                                   | MICHEL.....                   | Minéralogie.                                 |
|                                   | HÉROUARD.....                 | Zoologie.                                    |
|                                   | LÉON BERTRAND.....            | Géologie.                                    |
| <i>Professeurs adjoints</i> ..... | Rémy PERRIER.....             | Zoologie (Enseignement P. C. N.).            |
|                                   | COTTON.....                   | Physique.                                    |
|                                   | LESPIEAU.....                 | Chimie.                                      |
|                                   | GENTIL.....                   | Pétrographie.                                |
|                                   | SAGNAC.....                   | Physique (Enseignement P. C. N.).            |
|                                   | PEREZ.....                    | Zoologie (Evolution des êtres organisés).    |

*Secrétaire* ..... D. TOMBECK.



A LA MÉMOIRE  
DE MON PÈRE ET DE MA GRAND'MÈRE

A MA MÈRE

A TOUS LES MIENS

*Hommage de reconnaissante et très profonde  
affection.*





## PRÉFACE

---

Au cours d'une séance de travaux chimiques à l'Ecole de Médecine et de Pharmacie de notre Université, séance consacrée à la recherche du formol dans le lait, nous avons conseillé d'aciduler le liquide, avant distillation, avec de l'acide sulfurique, afin d'en isoler plus sûrement l'aldéhyde. Cela fait, après quelques instants d'ébullition, nous vîmes le liquide des cornues, primitivement blanc, devenir rouge groseille, puis violacé, cette dernière teinte s'accroissant avec le temps.

Surpris par ce phénomène, et cherchant ultérieurement à élucider la cause de cette réaction colorée, nous reconnûmes : tout d'abord, que l'acide sulfurique chimiquement pur ne donne pas cette réaction, et que l'acide primitivement employé contenait des produits nitreux ; ensuite, que parmi les éléments du lait, les matières protéiques seules intervenaient pour sa production ; et enfin, que cette réaction ne leur était pas spéciale, mais appartenait à la généralité des substances albuminoïdes. La coloration violette observée résultait de l'action mutuelle des corps suivants : matières protéiques du lait, formaldéhyde, acide sulfurique nitreux.

Immédiatement après ces constatations, nous observions également que l'acide chlorhydrique contenant des traces de chlore ou de composés nitreux, conduisait au même résultat que l'acide sulfurique : comme il est plus maniable et bien moins violent dans ses réactions que ce dernier, c'est cet acide qui nous a toujours servi dans la suite de nos expériences. Il intervient comme agent d'hydrolyse et de condensation dans notre réactif *albumine-acide chlorhydrique nitreux* ou réactif *protéique acide*, que nous avons utilisé tout d'abord pour la recherche analytique du formol, notamment dans les matières alimentaires, comme le lait. Ce réactif donne une belle coloration violette avec l'aldé-



hyde formique, même à dose infinitésimale ; la sensibilité dépassant le millionième.

En poursuivant notre étude, nous avons encore reconnu que le méthanal n'est pas le seul des corps à fonction aldéhydique capable de donner une réaction colorée avec la solution d'albumine dans l'acide chlorhydrique nitreux. Dans les mêmes conditions, la plupart des aldéhydes gras et aromatiques donnent également des colorations, mais qui sont généralement distinctes de la coloration violette fournie par l'aldéhyde formique. En particulier, et pour n'en citer que deux, dont le second joue un rôle fondamental dans ce travail, l'aldéhyde acétique donne une coloration jaune, l'acroléine une coloration verte, bleu verdâtre ou bleue, suivant les dilutions.

Le réactif *protéique acide* se présente donc comme un réactif de coloration des aldéhydes, et, inversement, l'association d'un aldéhyde avec l'acide chlorhydrique nitreux constitue un réactif de coloration des matières albuminoïdes.

En cherchant à reconnaître la cause de cette nouvelle réaction colorée des substances protéiques et des aldéhydes, en choisissant comme type le plus simple des corps de cette fonction, le méthanal, nous avons vérifié que la coloration violette était due à la condensation avec l'aldéhyde formique, de produits à noyau pyrrolique résultant de l'hydrolyse de l'albumine en milieu acide, comme le tryptophane ou acide indol-amino-propionique et ses dérivés, indol et scatol ; condensation suivie d'une oxydation par les produits nitreux intentionnellement ajoutés dans l'acide du réactif, ou naturellement contenus, comme dans l'acide sulfurique ordinaire primitivement employé, impureté qui nous a si heureusement servi pour la révélation de cette réaction. Elle n'est positive qu'avec les matières albuminoïdes dont la molécule contient le groupement de cet acide aminé, le tryptophane : en particulier, la caséine donne la réaction, mais non la gélatine.

La possession d'une réaction colorée du méthanal aussi

sensible et *distincte* de celles données dans les mêmes conditions par les autres aldéhydes de la série grasse, notamment son homologue supérieur, l'éthanal, doit rendre de précieux services, non seulement dans la recherche de quantités très petites de formaldéhyde, mais encore dans la reconnaissance de tous les corps capables de l'engendrer. En particulier, elle nous a servi à instituer un procédé de recherche de l'alcool méthylique dans l'alcool ordinaire et dans les alcoolés en général; à déceler l'hexaméthylène-tétramine employée comme agent désulfiteur des moûts et des vins. Cette réaction colorée est devenue classique et plusieurs auteurs ont fait mention de son emploi au cours de leurs travaux.

L'application minutieuse de notre nouvelle méthode de recherche de l'alcool méthylique dans les spiritueux, basée sur sa transformation partielle en aldéhyde formique par oxydation nous a permis de reconnaître la production constante de traces de cet aldéhyde dans l'oxydation ménagée de l'alcool éthylique, absolument pur de son homologue inférieur ou de composé méthylique en général : cette oxydation étant le résultat, soit d'une action purement chimique, soit d'une telle action mise en jeu par une énergie physique, ou par l'intervention d'un être vivant comme les *mycodermes* des fleurs du vin et de la mère du vinaigre.

En raison de ce mode de production de l'aldéhyde formique, le problème suivant s'est immédiatement posé à nous : le méthanal existe-t-il dans les liqueurs fermentées ; en particulier, peut-on le déceler dans les vins, notamment les vins vieux ? En vue de répondre à cette question, nous avons entrepris une étude d'ensemble des produits aldéhydiques contenus dans les vins. Nos recherches n'ont pu nous démontrer la présence de l'aldéhyde formique dans ces liquides, mais, par contre, cette étude nous a révélé un fait important, capital pour ce travail dont il est l'origine : c'est l'*existence de l'acroléine dans les vins amers*, reconnue par la coloration bleue que donne le réactif *protéique acide* avec le distillatum d'un vin atteint de la maladie de l'amertume, et à l'aide des autres réactions de cette substance.



C'est ce résultat de l'expérience mis à jour dans une recherche destinée à un tout autre but qui nous a conduit à la reprise de l'étude de cette maladie et à l'isolement, par prélèvement dans un vin amer, d'un bacille végétant dans ces liquides, se comportant comme un agent de déshydratation de la glycérine et dénommé par nous *Bacillus amaracrylus*, pour cette double raison d'habitat et de fonction physiologique.

Au cours de son étude et sans nous demander encore quelle pouvait être l'origine de ce ferment des vins amers, nous avons abandonné sur la table du laboratoire, en été, un milieu de culture glycérimé préparé avec l'eau de Dijon et non stérilisé ni ensemencé avec ce ferment. Au bout de quelques jours, en voyant ce liquide entrer en fermentation, l'idée nous vint d'en soumettre une prise d'essai à l'action de notre réactif; nous constatons aussitôt qu'il contenait de l'acroléine.

Après avoir reconnu que la cause de cette action fermentaire était due à un microbe de l'eau et qu'elle n'était pas particulière à celle primitivement employée, ce nouveau résultat nous a fait entreprendre l'étude d'un bacille existant dans les eaux et capable, lui aussi, de déshydrater la glycérine; bacille des eaux que nous avons ensuite comparé avec celui des vins amers, en vue de leur identification, d'abord présumée en raison de nombreuses analogies morphologiques, biologiques et physiologiques, puis confirmée par l'étude comparative approfondie.

En résumé, voilà par quel lien expérimental ininterrompu la recherche classique du formol dans le lait nous a conduit, d'abord à l'institution d'une nouvelle réaction colorée des matières albuminoïdes et des aldéhydes en général, du méthanal, de l'éthanal et de l'acroléine en particulier; ensuite à la découverte, à l'isolement, à l'étude d'abord séparée puis comparative, et finalement à l'identification de deux êtres microbiens végétant, l'un dans les vins amers, l'autre dans les eaux, *et dont la fonction physiologique typique est leur pouvoir déshydratant à l'égard de la glycérine.*

L'ensemble de ces faits d'une heureuse continuité montre, une fois de plus, que dans le travail, même courant, du laboratoire, tout phénomène surpris mérite reconnaissance. Dans leur étude, si nous considérons surtout les points de départ et d'arrivée, nous voyons la solution d'un problème banal du service de la répression des fraudes, éclairant d'abord et mettant finalement en pleine lumière un phénomène biochimique dont l'importance est à la fois théorique et pratique, puisqu'il attribue le pouvoir déshydratant à un être vivant et nous fait mieux connaître la cause et les effets de la maladie de l'amertume des vins.

Ces recherches ont été commencées en mai 1910, et nous avons publié une partie de leurs faits fondamentaux dans les *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* et dans les *Annales de l'Institut Pasteur* ; elles étaient presque achevées en août 1914, lorsque nous fûmes obligé de les interrompre pour répondre au décret de mobilisation et prendre part à la grande guerre : pendant cette longue et angoissante période, les trop courts loisirs laissés par nos obligations militaires ne nous ont pas permis d'en présenter plus tôt les résultats définitifs.

En terminant cet exposé des causes de notre travail, nous prions M. Gabriel Bertrand, professeur de chimie biologique à la Sorbonne et à l'Institut Pasteur, de vouloir bien agréer l'expression de nos sentiments de respectueuse et profonde gratitude.

---





# PREMIÈRE THÈSE

---

## ÉTUDE

DU

# BACILLUS AMARACRYLUS

AGENT DE DÉSHYDRATATION

DE LA

## GLYCÉRINE

---

### INTRODUCTION

L'activité des cellules vivantes donne lieu à une série de réactions chimiques souvent très complexes, parfois à effets contraires, et dont l'ensemble pour chacune résulte toujours d'un double travail d'analyse et de synthèse. Dans sa physiologie chimique, toute cellule est en effet le siège d'actions de destruction et d'actions de construction moléculaires, et, suivant les cas, l'un des processus domine l'autre.

Le travail de synthèse est surtout apparent dans la transformation de substances à molécule simple, ternaires par exemple, qui, soumises à l'action de ferments, s'oxydent, s'hydrogènent, se déshydratent en se condensant, ou se modifient d'autre façon en donnant naissance à des composés chimiques plus complexes que le corps originel, comme dans la fermentation mannitique du lévulose. Au contraire, dans la transformation des substances à poids moléculaire élevé, comme les albuminoïdes, c'est le travail d'analyse qui l'emporte, et la matière se résout par une série de dégradations successives en des corps de plus en plus simples.



En d'autres termes, le mot de *fermentation* qui exprime l'œuvre de la cellule ferment, ne doit pas évoquer dans l'esprit que l'idée de dislocation, de simplification, mais bien aussi celle corrélative de construction, d'accroissement, et même de complexité moléculaire.

A ne considérer que la réaction chimique principale, les fermentations peuvent être groupées en plusieurs catégories, dont l'une comprend des transformations dépendantes d'une *déshydratation* et présente, par ce caractère, un intérêt spécial à propos de l'étude que nous devons faire.

### Synthèse biochimique par déshydratation

Un certain nombre de transformations fermentaires conduisant à des produits de *synthèse*, s'effectuent avec élimination d'eau.

En particulier, la production par le *Leuconostoc mesenterioïdes* de la gomme de sucrerie, matière ternaire paraissant voisine de la dextrine, à laquelle Scheibler (1) donne le nom de *dextrane* ; la transformation du saccharose par divers ferments organisés, notamment le *Micrococcus viscosus* de Pasteur (2), le *Bacillus viscosus sacchari* de Kramer (3), en un hydrate de carbone également voisin de la dextrine, la *viscose* de Béchamp (4) : enfin la fermentation visqueuse d'autres sucres sous l'action d'autres ferments visqueux dont le nombre est considérable, rentrent dans cette catégorie. Parmi les substances qui en résultent, celles qu'on connaît le mieux comme la *dextrane*, ont la formule  $(C^6H^{10}O^5)^n$ , ce qui permet de les considérer comme dérivant d'un sucre par déshydratation avec soudure d'un nombre  $n$  de molécules : naturellement cette soudure peut donner lieu à des édifices très variés suivant le degré de condensation, mais tous sont des corps de synthèse.

(1) SCHEIBLER. — *Recherche sur la nature du dépôt dit « frai de grenouille »*. Journal des fabricants de sucre : novembre et décembre 1874.

(2) PASTEUR. — *Etudes sur le vin* : 1872 et 1886.

(3) KRAMER. — *Studien über die Schleimige Gährung*-Sitzungsber. der k. Acad. der Wissensch in Wien, x, p. 467 ; 1889.

(4) BÉCHAMP. — *Sur la viscose ou substance gommeuse de la fermentation visqueuse*. Comptes rendus, Acad. des Sc., t. 92, p. 78 ; 1881.

**Actions diastasiques réversibles.** — A part cette production d'*anhydroses* par des ferments figurés, la chimie biologique a enregistré au cours de ces dernières années d'autres transformations s'accomplissant avec soustraction d'eau, mais, *actions limitées par une réaction inverse d'hydrolyse, toutes dues à des ferments solubles, et conduisant également à des produits de synthèse.*

La première observation d'une telle action synthétique est due au chimiste anglais Arthur Croft Hill (1), qui paraît avoir pensé le premier à la notion de la réversibilité des ferments hydrolysants, en essayant de l'appliquer à la reconstitution du maltose. Ce savant, reprenant l'étude de la *maltase*, ferment soluble de la levure qui dédouble par hydratation la molécule de maltose en deux molécules de glucose, et la faisant agir sur une solution concentrée de ce dernier sucre, reconnut un changement sensible dans les pouvoirs rotatoire et réducteur du liquide, avec accroissement pour le premier et diminution pour le second, modifications correspondant à la formation d'un disaccharide qu'il crut être du maltose, au moins par l'essai à la phénylhydrazine, le produit de synthèse lui ayant fourni une osazone qui présentait la composition et les propriétés de la phénylmaltosazone ordinaire.

Depuis cette découverte qui a profondément changé l'aspect de la physiologie des échanges, on a fait connaître la réversibilité de l'action de toute une série de ferments solubles, lesquels seraient capables de catalyser aussi bien la réaction synthétique que la réaction analytique inverse. C'est ainsi que peu de temps après la publication du travail de Hill, Max Cremer (2) annonçait que de l'extrait de levure débarrassé de son glycogène et additionné de sucre fermentescible, recommence à montrer au bout de vingt-quatre heures, la réaction du glycogène, substance qui devient alors un produit de synthèse engendré par une réaction de déshydratation inverse du procès analytique classique de saccharification par hydrolyse. Cette synthèse du glycogène à partir du sucre présente un intérêt tout particulier, car, c'est sous la forme de glycogène que les hydrates de carbone

(1) A. CROFT HILL. — *Reversible Zymohydrolysis*. Journal of the Chemical Society, t. 73, p. 634, 1898 ; et *Reversibility of Enzyme of Ferment Action*. Journal of the Chemical Society, t. 83, p. 578 ; 1903.

(2) M. CREMER. — *Ueber Glykogenbildung im Hefe-Pressaft*. Berichte der Deutsch Chem. Ges., t. 32, p. 2062 ; 1899.



sont emmagasinés dans notre foie et dans nos muscles ; cet amidon animal étant comme l'amidon dans la plante, une matière de réserve où l'économie vient puiser au fur et à mesure de ses besoins l'énergie mécanique ou calorifique qui lui est nécessaire.

De même : la *maltase* unit le glucose et l'amygdonitrile-glucoside (Emmerling) (1) ; la *lactase* du Képhir unit le glucose au galactose pour donner l'isolactose (Fischer et Armstrong) (2) ; la *sérolipase* éthérifie l'alcool éthylique et l'acide butyrique (Kastle et Lœwenhart) (3), la glycérine et l'acide butyrique (Hanriot) (4) ; la *lipase pancréatique* éthérifie la glycérine et les acides gras supérieurs (Pottevin) (5) ; l'*émulsine* unit le glucose et la glycérine (Bayliss) (6), le glucose avec l'alcool éthylique et divers autres alcools (Bourquelot et Bridel) (7), en constituant des glucosides artificiels.

D'après les résultats de ces recherches, la lipase, dont le pouvoir saponifiant est connu depuis Claude Bernard (8), peut même, dans des conditions déterminées, se comporter comme un agent d'éthérification très actif : l'action synthétisante de l'émulsine peut également fournir un rendement élevé en glucosides d'alcools. Au contraire, certaines des autres diastases ne manifestent qu'une activité faible et ne donnent que des rendements médiocres dans leur travail synthétique ; souvent même les expériences étudiées au point de vue simplement qualitatif n'ont pas été toutes concluantes, le produit de synthèse n'ayant pas été obtenu en quantité suffisante pour que sa constitution chimique puisse être nettement établie ; enfin, leurs résultats sont parfois contradictoires, notamment en ce qui concerne

(1) O. EMMERLING. — *Synthetische Wirkung der Hefenmaltase*. Berichte der Deutsch. Chem. Ges., t. 34, p. 3810 ; 1901.

(2) E. FISCHER et F. ARMSTRONG. — *Synthese einige neuer Disaccharide*. Berichte der Deutsch. Chem. Ges., t. 35, p. 3144 ; 1902.

(3) J. KASTLE et A. LÖWENHART. — Amer. Chem. Journal, t. 24, p. 491 ; 1900.

(4) HANRIOT. — *Sur le mécanisme des actions diastasiques*. Comptes rendus, Acad. des Sc., t. 132, p. 146 ; 1901.

(5) POTTEVIN. — *Sur la réversibilité de l'action lipolytique*. Comptes rendus, Acad. des Sc., t. 136, p. 767 et 1152 ; 1903. — *Actions diastasiques réversibles*. Annales de l'Institut Pasteur, t. 20, p. 901 ; 1906.

(6) W. M. BAYLISS. — *The Journal of Physiology*, t. 43, p. XL, 455 et t. 44, p. IX ; 1912.

(7) E. BOURQUELOT et M. BRIDEL. — *De l'action synthétisante et de l'action hydrolysante de l'émulsine en milieu alcoolique*. Comptes rendus, Acad. des Sc., t. 154, p. 1737 ; 1912. — *Synthèse de glucosides d'alcools à l'aide de l'émulsine et réversibilité des actions fermentaires*. Annales de Chimie et de Physique, t. 29, p. 145 ; 1913.

(8) CLAUDE BERNARD. — *Leçons de Physiologie expérimentale*, Paris 1856.

l'obtention de l'isolactose et aussi de l'isomaltose (1), au lieu et place des isomères correspondants.

Néanmoins la découverte de Croft Hill marque une époque dans l'histoire de la chimie biologique. Si les résultats de ses patientes et laborieuses recherches ne paraissent pas suffire à instituer la doctrine de la réversibilité de la zymohydrolyse émise et énergiquement soutenue par ce savant, ils nous révèlent cependant que parmi les diastases qu'on croyait jusqu'alors vouées à des œuvres de décomposition, d'analyse moléculaire, il en existe qui peuvent, dans des conditions déterminées, jouer le rôle de diastases de construction, de synthèse moléculaire. C'est un nouveau gain réalisé par la chimie sur le domaine de la physiologie, mais dont celle-ci doit surtout et largement profiter.

Les travaux de G. Bertrand et de E. Buchner nous avaient montré sous un jour nouveau les phénomènes de la respiration et de la fermentation ; celui de Hill nous révèle le mécanisme de la synthèse d'un grand nombre de principes immédiats condensés : les uns et les autres, en nous renseignant sur l'origine causale du chimisme cellulaire, nous ont appris que ce sont les diastases, ces réactifs spéciaux, mis en œuvre par la cellule, qui règlent les équilibres caractéristiques de la vie.

En définitive, il résulte des travaux précédents, qu'en provoquant la séparation des éléments de l'eau de l'ensemble de plusieurs molécules identiques ou distinctes, un ferment peut édifier une molécule composée plus complexe que chacune des parties constituantes.

En chimie pure, ces exemples de synthèse par voie de déshydratation abondent. La soustraction d'eau s'effectue soit à l'aide de la chaleur seule, comme dans la préparation de certains anhydrides d'acides ( $\text{As}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Sb}_2\text{O}_5$ ), à partir de leurs hydrates, de l'acide pyrophosphorique et des pyrophosphates aux dépens de l'acide orthophosphorique et des orthophosphates, des pyrosulfates, aux dépens des bisulfates ; soit à l'aide de substances avides d'eau, comme dans la préparation de l'anhydride azotique par déshydratation de l'acide fumant au moyen de l'anhydride phosphorique ; soit

(1) O. EMMERLING. — *Synthetische Wirkung der Hefen-Maltase*. Berichte der Deutsch. Chem. Ges., t. 34, p. 600 et 2206 ; 1901.



enfin avec le concours simultané de la chaleur et d'agents chimiques jouant le rôle d'adjuvants ou même de catalyseurs dont les plus anciennement et encore les plus fréquemment employés sont les acides chlorhydrique et sulfurique, comme dans la préparation des éthers-sels et des éthers-oxydes.

La comparaison, naturellement limitée à leur résultat, de ces deux genres d'action synthétique, biochimique d'une part, physico-chimique d'autre part, et la constatation de la réversibilité de phénomènes chimiques provoquée par des agents issus du monde vivant, établissent deux nouvelles analogies entre les réactions de la chimie générale et celles de la chimie biologique.

### Analyse biochimique par déshydratation

Après cette révision très sommaire d'actions fermentaires *synthétiques* résultant d'une condensation moléculaire accompagnée d'une soustraction d'eau, la question complémentaire suivante se pose immédiatement. Existe-t-il en chimie biologique des exemples de transformation *analytique* par déshydratation, comme on en rencontre fréquemment en chimie pure ?

A notre connaissance, aucune réaction biochimique de ce genre, à part celle qui fait le sujet de l'étude actuelle, n'a été jusqu'à présent nettement démontrée. Les représentations schématiques d'une telle nature que l'on invoque pour expliquer les phénomènes chimiques de certaines fermentations, et notamment de la fermentation alcoolique suivant certains auteurs (1), (2), en attribuant, en particulier, au suc de levure, le rôle double et successif d'agent *déshydratant* et *hydratant* au cours de sa transformation analytique du glucose en alcool et acide carbonique, ne tablent encore le plus souvent que sur l'hypothèse.

Dans ce travail, nous allons faire l'étude d'un ferment *figuré* se comportant nettement comme agent de *déshydra-*

(1) A. BAEYER. — *Ueber die Wasserentziehung und ihre Bedeutung für das Pflanzenleben und die Gärung*. Ber., t. 3, p. 63-75 ; 1870.

(2) A. WOHL. — *Die neueren Ansichten über den chemischen Verlauf der Gärung*. Biochem. Zeitsch., t. 5, p. 45-65 ; 1907, and Zeitsch., angew. Chem., t. 20, p. 1169 ; 1907.

*tation*, au moins dans l'un de ses modes d'action à l'égard de l'une des substances sur lesquelles il exerce son activité ; mais ferment dont l'énergie conduit par cette voie, non plus à un produit de synthèse, mais bien à un produit d'*analyse*, *une seule* molécule de la substance fermentescible éliminant sous son action les éléments de deux molécules d'eau : il s'agit, en effet, de la transformation de la *glycérine* et de la constatation de l'existence de l'*acroléine* dans le liquide de fermentation.

Cette *transformation biochimique de la glycérine en acroléine* se trouve en parfaite compatibilité avec les analogies maintes fois reconnues et encore confirmées ici même entre les résultats de la chimie biologique et ceux de la chimie pure. La dégradation par voie de déshydratation d'une molécule complexe en une autre plus simple sous l'action d'un ferment satisfait pleinement à cette loi de similitude résultant de l'assemblage de faits qui tendent à faire disparaître la séparation artificiellement dressée entre ces deux parties de la même science. Habitues que nous sommes à voir les ferments travailler dans le même sens que les sources d'énergie du laboratoire, nous pouvons sans surprise reconnaître la déshydratation *biologique* de la glycérine comme comparable, quant au résultat qualitatif, à sa même transformation sous l'action de la chaleur seule ou de substances avides d'eau, comme les anhydrides borique, phosphorique, le bisulfate de potasse.

Bien plus, si nous comparons les ferments à des catalyseurs, dont ils possèdent le caractère fondamental par la disproportion entre la cause et l'effet produit, et si nous nous reportons aux expériences modernes de Senderens (1) sur la déshydratation catalytique de la glycérine par l'alumine ou son sulfate, nous sommes obligés de reconnaître une ressemblance encore plus complète entre ces deux formes, biologique et chimique, du même phénomène.

En chimie pure, la simplification moléculaire par voie de déshydratation marque souvent la première phase de la réaction que l'on exerce sur un corps, surtout à l'aide de la chaleur. En mettant en œuvre une quantité convenable de matière première, on peut obtenir rapidement et souvent

(1) J.-B. SENDERENS. *Bull. Soc. Chim.*, 4<sup>e</sup> série, t. 3, p. 828 ; 1908, et t. 9, p. 374 ; 1911.

même, lorsqu'il est instable, une dose suffisante du corps modifié pour en permettre la reconnaissance : à ce sujet, nous ne pouvons mieux faire que de citer en exemple précisément cette déshydratation de la glycérine qui sert de préparation à l'acroléine.

En chimie biologique, il est vraisemblable que le même mécanisme intérieur de dislocation se produit aussi et que dans certaines actions fermentaires une soustraction d'eau à la molécule fermentescible jalonne en quelque sorte la première étape de sa dégradation. Seulement ici, comme dans toute fermentation en général, cette réaction primitive peut être moins facile à reconnaître que dans le cas d'une action purement chimique, parce que, le phénomène étant inséparable de l'activité vitale, évolue lentement, ne s'accomplit bien que dans des liqueurs diluées contenant en dissolution des substances nutritives multiples, et se trouve limité par les produits de la transformation, lesquels, et souvent très rapidement, paralysent cette activité ; conditions auxquelles viennent encore s'adjoindre les métamorphoses chimiques ou biochimiques du corps, témoin de cette réaction initiale.

Pour toutes ces raisons, nous comprenons comment le mécanisme intérieur du mode de fonctionnement d'un ferment doit nous échapper en général et pourquoi l'étude des fermentations a surtout porté jusqu'ici et portera souvent encore sur les produits ultimes et définitifs. Faute de pouvoir les isoler ou les caractériser, on néglige généralement et forcément l'étude de ces termes de passage qui naissent dans le vase à fermentation et disparaissent ensuite ; produits de transition cependant beaucoup plus intéressants, au point de vue de la physiologie chimique de la cellule, que les substances secondaires, définitives, qui en dérivent.

La transformation *biologique* de la *glycérine* en *acroléine*, qui est la partie essentielle de ce travail, va nous mettre en présence de toutes les difficultés que nous venons de rappeler, difficultés accentuées au possible, l'acroléine étant une substance facilement altérable, surtout lorsqu'elle *naît* en milieu aqueux. Dans la famille des aldéhydes, corps remarquables par l'activité réactionnelle de leur molécule, l'aldéhyde *acrylique* est l'un des représentants le plus instable, à la fois par sa sensibilité à l'oxydation et aux agents



de décomposition, comme l'eau, en particulier; par sa faculté de polymérisation, de résinification et d'acétalisation. De plus, ce composé est toxique et ses produits de métamorphose solubles paralysent rapidement aussi l'activité des ferments : cette raison, d'ordre physiologique, permet de penser que l'un d'eux, après avoir engendré cet aldéhyde, s'efforcera ensuite de le transformer en produits moins nocifs.

En sorte que, à tout moment, même le plus opportun pour la recherche, l'acroléine ne peut exister qu'en minime quantité dans le liquide de fermentation : c'est certainement l'un de ces termes de transition, dont il vient d'être question, le plus difficile à reconnaître, et cependant le plus important à distinguer parmi les produits issus de la substance mère, la glycérine. Ce corps est, en effet, par la continuité de sa formation et de sa destruction dans le vase à fermentation, le véritable témoin du mode de fonctionnement, au point de vue analytique, de la cellule ferment à l'égard de cette substance. A ces difficultés, d'ordre chimique et biologique, il convient cependant d'opposer une qualité essentielle de cet aldéhyde, facilitant sa diagnose, qui est l'odeur extrêmement pénétrante qu'il communique à l'atmosphère de distillation des liquides n'en contenant même que des traces et dont l'irritation produite sur les muqueuses nasale et lacrymale est si vive et aide à le caractériser; propriété que nous avons souvent observée au cours de nos expériences.

C'est grâce à une réaction colorée très sensible et spéciale à cet aldéhyde, rencontrée à l'occasion de recherches antérieures, étrangères à ce sujet, que nous avons été amené à déceler d'abord son existence dans les *vins amers*, ce qui nous a conduit ensuite à l'étude d'un bacille retiré de ces liquides altérés; à la recherche de son origine; et à l'explication des divers phénomènes observés dans l'évolution de la maladie de l'amertume des vins.

\*  
\* \*

Dans cette étude, nous allons reproduire les faits dans l'ordre où ils se sont présentés à notre examen; ordre d'ail-

leurs parfaitement didactique et dont l'adoption va nous conduire à diviser notre travail en cinq parties.

PREMIÈRE PARTIE. — *Etude d'un ferment végétant dans les vins amers, le Bacillus amaracrylus, agent de déshydratation de la glycérine.*

DEUXIÈME PARTIE. — *Sur un bacille contenu dans les eaux, agent de déshydratation de la glycérine.*

TROISIÈME PARTIE. — *Etude comparative du bacille isolé de l'eau avec le Bacillus amaracrylus retiré d'un vin amer et avec d'autres microbes contenus dans les eaux.*

QUATRIÈME PARTIE. — *Recherches complémentaires sur la fermentation de la glycérine par le bacille des vins amers et par le bacille des eaux.*

CINQUIÈME PARTIE. — *Classification du Bacillus amaracrylus. — Conclusions générales.*

---

## PREMIÈRE PARTIE

---

### Etude d'un ferment végétant dans les vins amers, le *Bacillus amaracrylus*, agent de déshydratation de la glycérine.

---

Cette première partie de notre travail résulte de la constatation de l'existence d'acroléine dans les vins amers : voyons donc déjà comment nous avons été conduit à soupçonner d'abord la présence de ce composé dans ces vins et à en faire la preuve ensuite. Dans ce but, nous devons commencer par faire connaître la réaction colorée de l'acroléine qui nous a révélé cette présence et servi de guide précieux au cours de nos recherches.

#### Nouvelle réaction colorée de l'acroléine.

De tous les corps de la chimie organique, les aldéhydes sont ceux qui possèdent le plus de réactifs en raison de leurs affinités énergiques, se traduisant notamment par des réductions ou des condensations :

Les réactifs ordinairement employés pour reconnaître les aldéhydes sont généralement communs à toutes ces substances, tels : le nitrate d'argent ammoniacal, le bisulfite de rosaniline. Mais il existe aussi des réactions de coloration permettant d'identifier, souvent avec une extrême sensibilité, un aldéhyde déterminé. C'est ainsi que dans une étude antérieure (1), nous avons montré que l'aldéhyde formique pouvait être caractérisé, même à dose infinitésimale,

(1) E. VOISENET. — Sur une réaction très sensible de l'aldéhyde formique et des composés oxygénés de l'azote et qui est aussi une réaction de coloration des matières albuminoïdes. — *Bull. soc. chim.*, 3<sup>e</sup> série, t. 33, p. 1198 ; 1905.



par la coloration violette qu'il donne avec le réactif *albumine-acide chlorhydrique nitreux* : cet ensemble *protéique-acide* constitue un réactif de coloration pour la majorité des aldéhydes et fournit en particulier un excellent moyen d'identification de l'acroléine.

La préparation de ce réactif nécessite les deux solutions suivantes :

*Acide chlorhydrique nitreux*. — On l'obtient en ajoutant à 200<sup>cc</sup> d'acide chlorhydrique pur et concentré ( $d = 1,18$ ), 1/10 de centimètre cube d'une solution d'azotite de potasse pur à 3 gr. 6 pour 100.

En cas de traces d'aldéhyde, pour accroître la sensibilité de la réaction, on fait usage d'un acide moitié moins nitreux : nous désignerons chacun de ces acides par les symboles Hcl.  $a$  et Hcl.  $\frac{a}{2}$ .

*Eau albumineuse*. — On ajoute à un blanc d'œuf, 5 à 7<sup>cc</sup> d'eau distillée et l'on bat énergiquement : on filtre sur une toile en exprimant : on obtient ainsi une solution d'albumine à 10 p. 100 environ.

MODE D'EMPLOI. — A 5<sup>cc</sup> de la solution aldéhydique, on ajoute 1<sup>cc</sup> d'eau albumineuse, puis trois volumes, c'est-à-dire 18<sup>cc</sup> d'acide chlorhydrique nitreux ; on agite pour redissoudre l'albumine coagulée et on verse dans un tube à essai, que l'on place dans un bain-marie à 50° : au bout de quelques minutes, il se forme une coloration atteignant rapidement son maximum d'intensité, en moins d'un quart d'heure, et dont la nuance et les caractères spectroscopiques varient généralement avec l'aldéhyde.

Dans le cas de l'acroléine, la teinte est verte pour les solutions relativement riches ( $\frac{1}{2000}$ ,  $\frac{1}{5000}$ ) : bleu verdâtre pour les teneurs plus faibles, mais toujours précédée d'une coloration franchement verte ; à l'examen spectroscopique, on observe une forte bande d'absorption dans le rouge : la sensibilité dépasse le millionième. Ces colorations sont assez stables et demeurent plusieurs jours sans altération ; elles sont sensibles à l'action des réducteurs et surtout des oxydants qui les détruisent ou les empêchent de se manifester nettement : en particulier, lorsque l'aldéhyde acrylique est en excès, la coloration devient jaune ; il en est de même lorsque l'acide chlorhydrique est nitreux au-delà de la dose indiquée.

Aucun autre, parmi les nombreux aldéhydes soumis à pareil essai, ne nous a donné une réaction colorée semblable.

Cette réaction, par sa sensibilité et sa facilité d'exécution jointes à son caractère distinctif, constitue un excellent moyen de détermination de l'acroléine : c'est elle qui nous a permis de reconnaître la formation de cette substance dans la fermentation de la glycérine sous l'action du microorganisme provoquant la maladie de l'amertume des vins. Par voie indirecte, la même réaction peut servir à identifier exactement et rapidement d'autres corps dont cet aldéhyde est le dérivé immédiat, comme l'alcool allylique, la glycérine et les graisses, même lorsque ces corps sont en petite quantité : en particulier, on l'utilisera avantageusement pour la recherche de traces de glycérine et de corps gras, soit dans l'étude des fermentations, soit dans l'analyse des liquides et tissus de l'organisme ou des excréta biologiques, notamment dans les affections du pancréas ; dans la reconnaissance des urines grasses ou chyleuses, soit dans l'analyse de produits pharmaceutiques ou hygiéniques, en vue de savoir si un excipient est constitué par un corps gras, un glycéride.

**Formation d'acroléine  
dans la maladie de l'amertume des vins.**

Dans une étude sur les principes aldéhydiques des vins, en soumettant à l'action du réactif *albumine-acide chlorhydrique nitreux* les premiers fractionnements de distillation, nous avons été conduit à appliquer cet essai à un vin très amer : nous obtînmes ainsi dès le début une coloration bleu verdâtre, semblable à celle que donnent les solutions d'acroléine, tandis que les vins sans amertume, jeunes ou vieux, nous avaient toujours donné, dans les mêmes conditions et quel que soit le rang du fractionnement, une coloration plus ou moins jaune due à l'éthanal.

En vérité, ce résultat fourni par l'expérience nous causa une vive surprise. Comme, dans une étude antérieure (1), nous avions reconnu la formation d'aldéhyde formique dans l'oxydation de l'alcool éthylique par voie chimique, physique

(1) E. VOISENET. — *De la production de petites quantités d'aldéhyde formique dans l'oxydation de l'alcool éthylique par voie chimique, physique ou biologique.* — Comptes rendus, Académie des Sciences, t. 150, p. 40 ; 1910.

ou biologique, précisément à l'aide du même réactif *protéique acide*, qui est un réactif de choix pour cet aldéhyde, nos essais sur le vin avaient pour but de savoir si des traces de cette substance, décelables par le réactif, n'existeraient pas dans ce liquide. L'expérience ainsi consultée nous donna un résultat négatif sur ce point, mais par contre, elle nous conduisit à la découverte d'un fait autrement intéressant par lui-même et par ses conséquences, celui de l'*existence de l'acroléine dans les vins amers*.

Connaissant les propriétés colorimétriques de notre réactif à l'égard des aldéhydes, la coloration bleue qu'il venait de nous donner avec les fractionnements de tête de la distillation d'un vin amer était très vraisemblablement due à une substance possédant cette fonction chimique. En nous rappelant alors, que dans une étude d'ensemble relative à l'action du réactif *protéique acide* sur les aldéhydes, effectuée cinq années auparavant, nous avions obtenu une coloration analogue avec un certain représentant de cette catégorie de corps, il nous fut facile, en consultant nos notes, de le qualifier comme aldéhyde acrylique.

En réalité, voilà comment et par quelle liaison d'idées et de faits antérieurement acquis, l'expérience en question a été l'origine de toutes nos recherches concernant ce travail.

MODE OPÉRATOIRE. — On acidule 100<sup>cc</sup> de vin avec dix gouttes d'acide sulfurique pur, pour libérer, au moins en partie, les aldéhydes combinés, et l'on introduit le liquide dans un ballon de 150<sup>cc</sup> muni d'un tube de condensation mesurant 4<sup>m/m</sup> de diamètre intérieur et 30<sup>cm</sup> de long, entouré d'un réfrigérant sur une longueur de 20<sup>cm</sup>. La distillation qui doit être très lente est conduite à l'aide d'un Bunsen brûlant en veilleuse : on reçoit le distillatum dans une éprouvette graduée de 50<sup>cc</sup> par fractionnements de 5<sup>cc</sup> à chacun desquels on applique la réaction précédemment décrite.

Il restait à confirmer par d'autres preuves l'existence ainsi soupçonnée de l'aldéhyde acrylique dans les vins amers. Après avoir concentré sous un petit volume de distillatum les éléments les plus volatils du vin, dont l'acroléine doit faire partie en raison de son point d'ébullition peu élevé, 52°4, nous avons procédé aux essais suivants.

*Examen organoleptique.* — Le liquide tiédi émet des vapeurs à odeur spéciale, irritant les muqueuses nasale et lacrymale. Ce caractère n'est pas constant et ne s'observe



pas avec tous les vins amers : dans un travail spécial, annexe de celui-ci, et portant sur la maladie de l'amertume, nous envisagerons les causes de cette inconstance dont la principale est l'acétalisation de l'acroléine.

*Réactions colorées avec les phénols.* — D'après deux études très documentées de MM. Barbet et Jandrier (1) et de M. Istrati (2), tous les phénols donnent des réactions colorées avec les aldéhydes en présence d'acide sulfurique pur, et certaines sont considérées comme spécifiques de l'acroléine ; parmi ces dernières, il convient de citer :

Le *phénol*, qui fournit une belle couleur héliotrope quand le titre de la solution acrylique ne dépasse pas le millième ;

La *résorcine*, qui produit une coloration bleu de lin pâle avec les solutions d'acroléine dont le titre est voisin du millième ;

Le *pyrogallol*, qui donne une coloration violet lie de vin pour les solutions dont le titre est voisin du millième ;

La *codéine*, qui fournit une coloration verte.

Pour exécuter ces réactions, on introduit dans un tube à essai une pincée du composé phénolique ou 1/5 de centimètre cube d'une solution alcoolique du réactif saturée à la température ordinaire (une seule goutte pour la codéine), puis environ 2<sup>cc</sup> d'une solution alcoolique de l'aldéhyde ; après dissolution, on fait pénétrer au fond du tube un centimètre cube d'acide sulfurique pur : la coloration se produit au niveau de la séparation des deux liquides.

A ces réactifs, on peut encore ajouter l'acide *naphthoïque*  $\beta$  ou *acide naphthalène monocarbonique*  $\beta$ , corps non phénolique qui donne avec l'acroléine, par une réaction sensible au dix-millième, une coloration jaune avec fluorescence verte de l'acide sulfurique.

En appliquant ces essais au distillatum d'un vin amer, nous avons obtenu : avec le *phénol*, après dilution de la liqueur au demi, une belle couleur héliotrope ; avec la *résorcine*, un anneau rouge orangé surmonté d'un bel anneau bleu de lin, séparés par une zone incolore ; avec le *pyrogallol*, un anneau violet lie de vin superposé à un anneau

(1) E. BARRET et JANDRIER. — Contrôle de la pureté des alcools. Congrès de chimie appliquée, t. 1. p. 472 ; 1896.

(2) C. ISTRATI. — Réactions permettant de déceler les aldéhydes dans les alcools. *Bull. de la Soc. des Sc. de Bucarest*, n° 2, p. 163 ; 1898.

(1) et (2) GIRARD et CUNIASSE. — *Manuel de l'analyse des alcools*.

orangé rouge; avec la *codéine* et l'acide *naphthoïque*  $\beta$ , les colorations précédemment indiquées.

*Action sur le permanganate de potasse.* — Les aldéhydes, corps éminemment oxydables, décolorent facilement le permanganate de potasse : l'acroléine, particulièrement instable, réduit avidement ce réactif, et cette activité est environ trois mille fois plus forte que celle de l'éthanal. En versant dans une prise d'essai du distillatum précédent une solution de permanganate à 0 gr. 2 par litre, nous avons pu décolorer instantanément un volume considérable de ce réactif.

*Expérimentation physiologique.* — L'acroléine est très vénéneuse : à dose égale, son pouvoir toxique est incomparablement plus élevé que celui du furfurol, qui passait pour l'impureté la plus dangereuse des alcools avant les travaux de MM. Barbet et Jandrier. A ce sujet, nous avons effectué à quelques jours d'intervalle les deux essais comparatifs suivants sur un lapin du poids de 2 kg. 300.

*Premier essai.* — Injection directe dans le sang de 10<sup>cc</sup> d'alcool à 38° résultant de la distillation d'un vin sain : le lapin ne meurt pas.

*Deuxième essai.* — Injection de 10<sup>cc</sup> d'alcool à 38° provenant de la rectification d'un vin semblable au précédent comme origine et comme âge, mais très amer : le lapin est foudroyé.

La concordance de ces faits révèle donc très nettement l'existence de l'acroléine dans les vins amers et confirme déjà la préférence marquée du ferment de l'amertume pour la glycérine. A ce faisceau de preuves, nous allons pouvoir adjoindre dans la suite de cette étude un contrôle expérimental qui les rendra plus évidentes encore, en montrant qu'on peut isoler de ces vins un ferment capable de transformer, en milieu artificiel, la glycérine en acroléine et de reproduire la maladie par ensemencement dans d'autres vins sains.

La reconnaissance de ce produit de déshydratation sera même plus facile dans un milieu artificiel de culture que dans un vin altéré, car, d'une part, et indépendamment de sa genèse plus rapide, l'absence d'alcool, au moins en quantité suffisante, évitera la transformation partielle de l'acroléine par acétalisation, et l'examen organoleptique du distillatum, précédemment décrit, aura une

valeur d'autant plus grande : d'autre part, les réactions colorées que nous venons d'indiquer, tout en étant spéciales à l'acroléine, ne seront pas faussées par celles que donnent d'autres aldéhydes dans les mêmes conditions, influences que l'on ne peut éviter en les pratiquant avec le distillatum d'un vin. Bien plus, en l'absence de ces aldéhydes étrangers, nous pourrions encore étendre le contrôle en caractérisant l'acroléine par des réactions complémentaires.

Ajoutons que nous avons pu compléter les recherches qualitatives précédentes en dosant comparativement et par colorimétrie, à l'aide du réactif *protéique acide*, les quantités d'acroléine libre et combinée, contenues en dissolution dans plusieurs vins amers : l'examen des résultats, qui seront inscrits dans notre travail sur la maladie de l'amertume des vins, montre comme quantité maxima *div-huit centigrammes* par litre pour l'un de ces vins.

Ces faits expérimentaux étant reconnus, il restait à savoir par quel mécanisme biochimique s'effectue cette dégradation de la glycérine en acroléine ?

*Est-elle directe ou s'accomplit-elle avec le concours d'une autre substance de formation intermédiaire ?*

*Est-elle le résultat d'une action cellulaire ou d'une action diastasique ?*

*Enfin, quelle est, dans son ensemble analytique et synthétique, la fonction physiologique du ferment de l'amertume vis-à-vis de la glycérine ?*

Le désir de répondre à ces questions nous a conduit à faire l'étude générale suivante d'un bacille végétant dans les vins amers.

### Etude du *Bacillus amaracrylus*

Tout d'abord, nous nous sommes efforcé d'assurer dans nos cultures la pureté de la semence, condition primordiale pour une étude précise.

*Origine et isolement du bacille.* — Le ferment a été prélevé dans un vin originaire d'un grand cru de la côte de Nuits-Saint-Georges, récolte 1904, offrant nettement les caractères d'un vin amer, tant par le goût que par l'examen



microscopique et chimique, donnant en particulier la réaction de l'acroléine avec le mélange protéique acide, contenant dix centigrammes de cet aldéhyde par litre et présentant une culture remarquable comme abondance, vitalité et relative pureté. Nous avonsensemencé trois milieux de culture différents, chacun avec une goutte de ce vin.

*Ensemencement dans le milieu minéral de Laurent, additionné de peptone, de composition suivante :*

|                               |           |
|-------------------------------|-----------|
| Sulfate d'ammoniaque .....    | 4 gr. 50  |
| Phosphate monopotassique..... | 0 gr. 55  |
| Sulfate de magnésie .....     | 0 gr. 10  |
| Peptone .....                 | 10 gr.    |
| Eau.. ..                      | Un litre. |

Ce liquide de culture primitivement limpide, maintenu à une température voisine de 30°, commence à devenir louche au bout de deux ou trois jours, puis nettement trouble après une semaine, avec formation à la longue d'un léger dépôt blanchâtre : pendant ce développement microbien, il ne se produit aucun dégagement gazeux perceptible et la saveur du liquide n'est pas sensiblement modifiée.

*Ensemencement dans l'eau de levure concentrée très légèrement alcalinisée avec la potasse et additionnée de glucose.*

Ce liquide fournit également au bout d'une à deux semaines, à une température voisine de 30°, une culture offrant les caractères de la précédente, mais peu abondante et avec production d'un léger dégagement gazeux.

*Ensemencement dans le milieu minéral de Laurent, additionné de glycérine, de composition suivante :*

|                               |           |
|-------------------------------|-----------|
| Sulfate d'ammoniaque .....    | 4 gr. 50  |
| Phosphate monopotassique..... | 0 gr. 55  |
| Sulfate de magnésie .....     | 0 gr. 10  |
| Glycérine.....                | 10 gr.    |
| Eau .....                     | Un litre. |

Ce milieu, peu nutritif, ne contenant d'autre azote et d'autre carbone alimentaires que de l'azote ammoniacal et le carbone de la glycérine, soumis aux mêmes conditions que les deux précédents, devient rapidement trouble et fournit, malgré son apparence de disette, une culture abondante avec production d'une légère effervescence gazeuse et for-

mation d'acroléine dont l'existence est facilement révélée par le réactif protéique acide.

L'emploi d'un tel milieu est doublement avantageux pour l'isolement de l'espèce bactérienne que nous recherchons : car, la production de l'aldéhyde acrylique témoigne d'abord du développement de cette espèce ; ensuite, sa pauvreté alimentaire empêche la multiplication de nombreux autres ferments présents dans le vin et qui doivent pulluler dans les deux milieux précédents, beaucoup plus nutritifs.

*Obtention d'une culture pure.* — Le ferment a été purifié par ensemencements successifs dans ces divers milieux, principalement dans le dernier, puis isolé par des cultures, à la température de 20°, sur plaques de gélatine préparées à la manière ordinaire, à l'aide d'une macération aqueuse de viande additionnée de gélatine, de peptone, de sel marin, et rendue très légèrement alcaline.

Les colonies sont tardives, apparaissent irrégulièrement, d'ordinaire seulement après cinq à six jours, quelquefois au bout d'un temps plus long ; elles sont minuscules, arrondies en forme de point, blanches d'abord, devenant légèrement jaunâtres à la longue, non liquéfiantes : à l'examen microscopique, on reconnaît que chacune d'elles est constituée par une agglomération de petits bâtonnets.

Choissant une plaque contenant un très petit nombre de colonies, nous avons prélevé à trois reprises une trace de l'une d'elles, laquelle, ensemencée dans chacun des trois liquides précédents, nous a donné au bout de quelques jours, à la température de 30°, des cultures d'un bacille présentant les caractères suivants.

## Caractères généraux du *Bacillus amaracrylus*

### A. — MORPHOLOGIE ET BIOLOGIE GÉNÉRALE

a) *Formes, dimensions, coloration.* — Un prélèvement effectué dans chacune de ces cultures et examiné au microscope (objectif Zeiss, F, oculaire de Huygens, 4, grossissement 930), révèle l'existence d'une multitude de petits bâtonnets mesurant en moyenne 0,8 $\mu$  de largeur sur 2 à 4 $\mu$  de longueur, généralement isolés, parfois juxtaposés bout à bout ; formant, surtout dans les cultures âgées, des filaments articulés plus ou moins longs, droits, courbes ou

sinueux, simples, quelquefois groupés en faisceaux ramifiés : ces caractères morphologiques s'observent par l'examen direct ou mieux après coloration au bleu de méthylène boracique.

Cette forme en bâtonnet que l'on peut considérer comme normale, subit des variations en rapport avec la qualité et les conditions du milieu de culture. En particulier, ce bacille cultivé dans les milieux additionnés d'antiseptiques, spécialement dans les milieux phéniqués, se présente en articles très courts, parfois même à aspect de diplocoques.

*Coloration.* — Ce microbe se colore facilement par les procédés classiques et fixe assez rapidement les couleurs d'aniline. En lui appliquant la méthode de Gram, il nous est arrivé d'obtenir des résultats contradictoires. Pour cet important élément de diagnostic, nous avons toujours employé des cultures en milieu glycérimé, peptoné ou surtout purement minéral. En utilisant la méthode primitive de Gram, avec le violet de gentiane aniliné et la solution d'iode faible, la décoloration par l'alcool à 95°, ou même absolu, et suffisamment prolongée a été plus ou moins incomplète, parfois même à peine sensible avec certaines cultures déjà anciennes : c'est pourquoi nous avons tout d'abord qualifié ce microbe comme prenant le Gram. Au contraire, en effectuant de nouveaux essais suivant cette méthode modifiée par Nicolle, avec le violet de gentiane phéniqué et la solution d'iode forte, la décoloration par l'alcool-acétone a été complète. Cette espèce microbienne serait-elle, comme quelques autres, indifférente à l'égard de la méthode de Gram, restant colorée dans certaines conditions et se décolorant dans d'autres ? A ce sujet, il convient de remarquer que la contradiction annoncée peut n'être qu'apparente, attendu que les deux méthodes qui la révèlent diffèrent sur plusieurs points, et à la fois, par le mordant à l'aniline ou à l'acide phénique, par la concentration de la solution d'iode faible ou forte, par le décolorant, alcool ou alcool-acétone, et par la durée : en particulier, il est possible qu'un mordant basique favorise mieux la fixation du colorant sur notre microbe qu'un mordant acide. Quoiqu'il en soit, comme le procédé de Nicolle donne des résultats plus certains et plus nets que le procédé primitif de l'auteur de la méthode, et qu'il est habituellement suivi, nous classerons le *Bacil-*



*lus amaracrylus* dans la catégorie des microbes *ne prenant pas le Gram*.

b) *Motilité*. — Ce bacille appartient au monde si peuplé des bactéries mobiles. Il est doué de mouvements très vifs, appréciables surtout chez le ferment jeune : c'est un phénomène très curieux qui se passe sous l'objectif du microscope et l'observateur assiste à la fois aux pirouettes désordonnées et localisées des jeunes bacilles et à la mobilité des bâtonnets adultes parcourant en tous sens le liquide de la préparation ; ces mouvements s'observent soit par l'examen ordinaire sur lame recouverte d'une lamelle, soit par l'examen en goutte pendante.

Cette motilité se rencontre aussi, quoique avec des mouvements beaucoup moins vifs chez les filaments de bâtonnets qui cheminent par reptation ondulatoire dans la préparation. Elle devient très réduite dans les cultures additionnées d'antiseptiques, spécialement dans les milieux phéniqués. Elle peut également s'atténuer beaucoup chez certains types, même dans des conditions de vie normale.

A part la contractilité du protoplasme qui joue certainement un grand rôle dans la production des mouvements, cette motilité est due en outre à des cils vibratiles dont l'abondance chez les bacilles très jeunes et encore très courts doit contribuer à en dissimuler la forme. En utilisant une culture jeune en milieu liquide glyciné, ou mieux encore sur gélose, nous avons pu, dans l'un et l'autre cas, mettre en évidence ces organes de mouvement à l'aide de la méthode de coloration de Loeffler. Nous avons reconnu alors la présence de cils vibratiles, au nombre de 4 à 6, quelquefois moins, rarement plus : ces cils sont répartis sur toute la surface du bâtonnet ou exceptionnellement en bouquet aux extrémités ; très souvent on observe à l'une seule, ou aux deux extrémités, un très long cil généralement ondulé ; quelquefois même, le bacille ne montre que ces cils terminaux ; enfin, la préparation renferme habituellement beaucoup de ces longs cils détachés des éléments microbiens.

c) *Reproduction*. — Ce bacille est-il sporifère ? A ce point de vue, l'examen microscopique d'une culture renfermant le ferment adulte et en bonnes conditions de vitalité, montre plusieurs sortes de bâtonnets : les uns, en quantité largement prédominante et uniformément cylindriques,

représentent une forme purement végétative : d'autres, relativement rares, plus courts que les précédents, offrent un renflement à une extrémité, ce qui donne à ces bâtonnets l'aspect d'une épingle courte, d'une baguette de tambour ou bacille en raquette : quelquefois, deux de ces bâtonnets se soudent par leur extrémité non renflée et l'ensemble présente alors l'aspect d'une haltère, aspect qui peut aussi résulter du renflement d'un même bacille à ses deux extrémités. Ces deux formes rappellent, quoique avec beaucoup moins de netteté : la première, celle du bacille du tétanos, sans spores, purement végétatif ; la seconde, celle beaucoup plus typique de ce même bacille correspondant à la phase sporulaire.

Mais ces renflements terminaux sont-ils, comme pour le bacille du tétanos, corrélatifs d'un phénomène de sporulation ? Nous ne le croyons pas, car à aucun moment de leur évolution, ils ne présentent l'aspect de spores ; ils n'en possèdent pas la réfringence habituelle ni les caractères de coloration usuels, ni l'exagération de la résistance aux agents de destruction. Ces articles renflés à une extrémité, sans apparence de spores, ces éléments en haltères, doivent plutôt être considérés comme de véritables formes d'involution.

C'est seulement dans des conditions anormales d'existence difficile que nous avons observé ce puissant moyen de rajeunissement et de perpétuation de l'espèce par formation de spores. Dans un milieu de culture épuisé, privé de l'une des substances indispensables à la végétabilité de la forme adulte ou encombré des produits de désassimilation du bacille et des transformations chimiques qu'il a opérées, nous avons quelquefois pu reconnaître que des spores apparaissent au sein du protoplasma cellulaire sous forme de petits corpuscules arrondis, séparés, disposés en ligne et réfringents ; en même temps, la culture renferme un certain nombre de spores mises en liberté par résorption du filament qui les contenait, isolées ou réunies en agrégats : dans ces conditions, elles existent même parfois à peu près seules et peuvent en imposer alors pour des cocci.

Pour ne pas confondre ces spores avec de simples granulations, matière morte qu'on rencontre dans les articles microbiens âgés, nous avons vérifié que la résistance à la chaleur du bacille vieilli est supérieure à celle de l'être

adulte, en ce qui concerne la faculté de reproduction : ce dernier, soumis à l'action de la chaleur humide étant tué au bout d'une minute à la température de 80°, tandis qu'une culture ancienne manifeste parfois encore des qualités reproductives, fertilisantes, après un maintien d'une durée de dix minutes à cette température ou de une minute à la température de 85°. Cette reproduction par spores trouve aussi un appui dans le fait que des cultures âgées de plus d'une année ont pu encore nous servir pour le rajeunissement de l'espèce. Nous avons observé ce fait, notamment avec des cultures en milieu minéral, de qualité nutritive médiocre : il est vrai de remarquer que c'est principalement dans ces conditions de vie défectueuse que le phénomène de la sporulation tend à se manifester.

Pour obtenir la coloration des spores, devant, elle aussi, servir au contrôle des faits précédents d'observation directe, nous avons employé la méthode suivante :

Une goutte de culture ancienne, en milieu minéral glyciné, est étalée sur une lame ; on laisse sécher et on fixe à l'alcool-éther pendant deux à trois minutes. On mordance la préparation en la recouvrant d'une solution d'acide chromique à 5 o/o qu'on laisse agir pendant cinq minutes ; on lave à l'eau, on verse plusieurs gouttes de solution de fuchsine phéniquée de Ziehl, et on chauffe au-dessus d'une petite flamme jusqu'à émission de vapeurs, pendant cinq à dix minutes, en renouvelant le colorant pour éviter la dessiccation de la préparation, *état qui ne doit jamais être atteint*. On lave ensuite à grande eau pour enlever l'excès de colorant, puis on différencie en plongeant la lame pendant trente secondes à une minute dans une solution aqueuse de chlorhydrate d'aniline à 2 o/o ; finalement on lave à l'alcool à 96°, qui décolore toute la préparation, à l'exception des spores. On examine au microscope et si la décoloration est incomplète, on traite à nouveau par le chlorhydrate d'aniline et l'alcool.

On procède alors à la recoloration des bacilles en recouvrant la préparation d'une solution aqueuse ou boracique de bleu de méthylène ; on laisse en contact pendant dix minutes, on lave à l'eau et on sèche : à l'examen microscopique, les bacilles apparaissent colorés en bleu pâle et les spores en rouge vif.

d) *Aérobiose* ou *Anaérobiosé*. — Il n'y a pas, en réalité et au sens absolu du mot, de cellule *anaérobie* : toutes ont besoin d'oxygène pour respirer et se multiplier. C'est ce que nous constatons en particulier pour la levure : dans la vie sans air, elle ne se multiplie que médiocrement, en raison de la très grande rareté de l'oxygène et c'est précisément dans ces conditions de moindre végétation que la fermenta-



tion est la plus active par suite d'une sécrétion diastasique plus abondante. Il n'en est pas moins vrai que la cellule de levure demeure *aérobie* dans sa *vie anaérobie* : Pasteur nous a montré qu'une trace d'oxygène réveille une fermentation languissante en agissant comme un excitant de l'activité protoplasmique.

Il résulte des expériences de Duclaux et de divers autres savants que l'oxygène se comporte comme un aliment respiratoire ou comme un antiseptique. Pour tous les ferments, il est utile à une certaine dose, nuisible à une dose plus forte : cette quantité étant estimée par la pression sous laquelle il est présenté : on a pu établir pour chaque microbe qu'il existe une dose *optima*, excitante ou favorisante, et une dose *mortelle*, chacune variant avec les conditions ambiantes.

Duclaux (1) donne pour les anaérobies une explication très élégante :

« L'oxygène est un aliment que les anaérobies prennent à des substances qui le retiennent plus ou moins, comme l'eau ; c'est-à-dire qui opposent à son départ une résistance que nous pouvons représenter par une tension négative. Ces tensions, si elles étaient mesurables, constitueraient une échelle continue, comme l'échelle thermométrique : chaque microbe aurait sa zone. »

Dès lors, il n'y a plus de limites possibles entre les *aérobies* et les *anaérobies* : tous sont aérobies.

« Tous sont à la fois oxydants et réducteurs, dit Duclaux : tous prennent l'oxygène à une certaine substance qui, avec les anaérobies est souvent l'eau, avec les aérobies est d'ordinaire l'air, et font entrer cet oxygène dans des combinaisons variées. »

Cette distinction entre l'aérobiose et l'anaérobiose s'efface encore depuis que des travaux récents, principalement ceux de Rosenthal (2), ont montré qu'il est possible de faire vivre des anaérobies obligés types en véritables aérobies à l'aide de certaines méthodes et même de transformer un anaérobie vrai en un aérobie, non par transformisme d'espèce, mais par changement dans ses propriétés vitales : le phénomène inverse, l'adaptation d'un aérobie à la vie anaérobie pouvant s'obtenir aussi dans des conditions semblables.

(1) E. DUCLAUX. — *Traité de microbiologie*, t. 4, p. 384.

(2) G. ROSENTHAL. — *L'aérobisation des microbes anaérobies*. Paris, Alcan 1908.

Le bacille que nous étudions satisfait à ces conclusions générales sur la vie des ferments. Il ne se développe pas dans un milieu nutritif totalement privé d'oxygène ; sa spore n'y peut germer ; ce n'est donc pas un anaérobie vrai : en culture sur plaque, ses colonies se répartissent au sein de la gélatine, de préférence au voisinage de la surface.

Ensemencé dans un milieu liquide renfermant ou non une substance qu'il est capable de faire fermenter, il ne se développe bien qu'en présence d'une trace d'oxygène dont un excès, selon la dose, paralyse ou annihile complètement sa vie végétative. En obturant le vase à culture ou le vase à fermentation, entièrement rempli, par un bouchon traversé par un tube abducteur se rendant sur la cuve à eau, ou sur la cuve à mercure en vue d'une étude des gaz dégagés, on observe au bout de quelques jours une absorption dans le tube, quoique la pression extérieure n'ait pas varié et que la température initiale du liquide soit devenue très légèrement supérieure à celle de l'état initial ; absorption qui ne peut s'expliquer que par la disparition de l'oxygène contenu dans le vase clos, à l'état de dissolution dans le milieu de culture et de gaz dans l'atmosphère du tube : de plus, l'analyse montre que le liquide ne renferme plus de traces de l'oxygène qu'il avait redissous après sa stérilisation.

A ce moment de l'expérience, le liquide est louche, trouble, la culture déjà abondante, et il ne s'est encore dégagé aucun gaz : c'est la phase de multiplication rapide en *vie aérobie*, laquelle se traduit par une combustion *extérieure* au moyen de l'oxygène libre avec formation de gaz carbonique qui, dissous dans le liquide, occupe un volume moindre que l'oxygène de l'air contenu dans le tube et dont il dérive en partie.

Lorsque le milieu contient une substance fermentescible par le bacille, à cette période relativement courte succède celle, beaucoup plus longue, de la fermentation proprement dite, s'accomplissant en *vie anaérobie*, accompagnée d'un dégagement gazeux plus ou moins abondant dont l'un des composants, le gaz carbonique, provient alors d'une combustion *intérieure*, d'une dislocation de la molécule organique alimentaire fermentescible.

Le *Bacillus amaracrylus* vit donc réellement en anaérobie, lorsqu'il devient ferment, mais il reste aérobie dans sa vie anaérobie : il n'est qu'un *anaérobie facultatif*.

e) *Vitalité.*

1° *Conditions de température et durée de conservation.*—

Ce microbe se cultive bien entre 25° et 37°; la température *optima* pour obtenir une évolution rapide est comprise entre 30° et 35°; la végétation s'arrête à 48°; de 20° à 25°, il se développe bien, mais la fermentation est moins précoce et plus lente; vers 15°, il pullule encore assez bien; à 10°, son développement est très ralenti: le maintien prolongé à la température de zéro ne le fait pas périr; par l'action de la chaleur humide, il est tué au bout d'une minute à la température de 80° et après cinq minutes à 60°.

Les spores soumises à la dessiccation et à une chaleur sèche de 100° possèdent encore leur faculté germinative: elles sont aussi très résistantes à l'action du temps; des germes conservés pendant cinq à six mois, même dans des cultures ordinaires liquides qui sont toujours légèrement acides, peuvent se développer à nouveau, quoique avec un peu de retard. Dans un milieu neutre, la durée de conservation est beaucoup plus grande et les spores peuvent encore rajeunir l'espèce au bout de quinze à dix-huit mois.

2° *Action des antiseptiques et influence des substances paralysantes nées ou introduites dans les milieux de culture.*

—La résistance du *Bacillus amaraerylus* aux antiseptiques est relativement moyenne. Le bichlorure de mercure à la dose de un millième, l'acidephénique en solution à 10 p. 1000 le tuent en moins d'une heure. Il peut cependant supporter à la fois une dose faible d'acide phénique et une température assez élevée: c'est ainsi qu'il pullule assez rapidement en bouillon phéniqué à 1 p. 1000 et à la température de 42°.

Si on examine la réaction des milieux variés dans lesquels a poussé le bacille au contact des matières qu'il est capable de faire fermenter, on constate que cette réaction primitivement neutre ou très légèrement alcaline ou acide, suivant le milieu employé, est toujours finalement devenue franchement acide: en particulier, c'est par formation d'acide lactique que le lait se coagule lorsqu'il sert de milieu de culture au bacille; de même la végétation de ce microorganisme dans le vin a pour résultat constant et immédiat l'augmentation de l'acidité totale de ce liquide par transformation de ses matières sucrées et de sa glycérine. L'acidité augmentant au fur et à mesure de la pullulation du microbe



et de l'accroissement du procès fermentatif finit par nuire à son développement et à l'activité de la fermentation.

Il était intéressant de suivre l'évolution de ce bacille en milieu primitivement neutre, acide ou légèrement alcalin et de déterminer les *doses minima* de substances diverses, répandues naturellement dans le milieu, nées dans celui-ci au cours de la vie bactérienne ou intentionnellement ajoutées et capables d'arrêter à la fois la multiplication cellulaire et la fermentation.

Cette étude, outre qu'elle nous renseignera sur la marche, sur la limitation de la transformation de chacune des matières fermentescibles par le bacille, présente également un intérêt spécial par la connaissance qu'elle nous fournira sur les quantités de divers éléments naturels du vin capables d'influencer défavorablement la vitalité du ferment. A ce sujet, il est bien entendu que les résultats ainsi obtenus dans tous ces essais individuels n'auront qu'une valeur relative simplement approchée de celle qui intervient réellement en pratique dans le milieu de culture qu'est le vin, où plusieurs de ces éléments se trouvent naturellement associés.

Pour cette recherche, nous avons choisi comme milieu nutritif le liquide de Laurent peptoné précédent, et comme substance fermentescible la glycérine, ajoutée à dose de 10 grammes par litre de la solution. Dans un tel milieu, la multiplication cellulaire et la fermentation sont arrêtées pour les *doses minima*, par litre, des corps suivants :

|                                     |          |
|-------------------------------------|----------|
| Alcool.....                         | 100 gr.  |
| Crème de tartre .....               | 3 gr. 50 |
| Acide tartrique.....                | 1 gr. 10 |
| — formique.....                     | 0 gr. 40 |
| — acétique.....                     | 1 gr. 20 |
| — propionique.....                  | 1 gr. 10 |
| — butyrique.....                    | 1 gr.    |
| — acrylique .....                   | 1 gr. 40 |
| — lactique.....                     | 1 gr. 60 |
| — succinique .....                  | 1 gr. 40 |
| Soude ou potasse.....               | 1 gr. 50 |
| Nitrite de soude ou de potasse..... | 10 gr.   |
| Tannin .....                        | 1 gr. 60 |

Cette dernière substance précipitant la peptone de ses solutions, son action a été observée en milieu minéral, simplement glyciné.

En outre, l'*acroléine*, toxique pour les organismes supérieurs, est naturellement nuisible à la vitalité du bacille, qui cependant la fait naître de la glycérine, et elle arrête son développement à la dose de 0 gr. 15 par litre ou 0 gr. 20 à 0 gr. 25 après accoutumance ; quant à l'aldéhyde *hydracrylique*, produit intermédiaire de déshydratation de la glycérine, et dont nous avons admis la formation dans nos expériences qui suivent, la proportion tolérée par le bacille est notablement plus élevée, avec une limite située au voisinage de 3 grammes par litre.

Il est à remarquer qu'une quantité notable d'*acroléine*, 1 gramme ou même plus par litre, n'est pas mortelle pour le ferment et que la semence prélevée dans une telle solution, où elle est demeurée inerte pendant plusieurs jours, est capable de peupler un nouveau milieu non additionné de cet antiseptique, ou, plus généralement, favorable à son développement.

De même, si dans le liquide de Laurent, peptoné et rendu artificiellement acide à la dose de 10 grammes d'acide tartrique, le bacille ne se reproduit plus et n'agit plus sur l'un de ses aliments de choix, la glycérine, cette dose élevée d'acide tartrique, à la fois *antigénétique* et *antibiotique*, n'est cependant pas une dose mortelle pour le ferment, car, après avoir séjourné une semaine dans un tel milieu, si on le réensemence dans un liquide de culture semblable, mais neutre, il se développe à nouveau, donne même une culture abondante et fait fermenter activement la glycérine.

Enfin, il convient encore d'observer qu'une dose relativement élevée de glycérine n'empêche ni la multiplication du bacille, ni l'action déshydratante qu'il exerce sur ce tri-alcool : c'est ainsi que nous avons pu obtenir des cultures dans des milieux renfermant 200 grammes et même 500 grammes de glycérine par litre, et presque toujours avec réaction positive pour l'*acroléine*. Cependant, cette dernière concentration de 50 p. 100 doit être considérée comme une proportion limite : avec une richesse plus grande, la culture et la fermentation ne se produisent plus.

A ce sujet, il est intéressant de mentionner que la concentration d'un milieu sucré en glycérine, nécessaire et suffisante pour empêcher la fermentation alcoolique est d'environ 42 p. 100 ; dans ces conditions, la levure est simplement paralysée ; à la concentration de 50 p. 100, la levure

est tuée, mais l'enzyme, la zymase, plus résistante, peut encore exercer son action.

En un mot, la glycérine, qui agit comme antiseptique sur beaucoup de microorganismes, se comporte de même, mais seulement à doses très élevées, à l'égard du bacille que nous étudions.

En remplaçant dans ces essais la glycérine par une autre substance fermentescible par ce microbe, comme le saccharose ou le glucose, les nombres limites précédents deviennent légèrement plus élevés, vraisemblablement en raison de l'absence de formation d'acroléine, dont l'action antiseptique vient s'ajouter à chacune des substances soumises à l'étude précédente faite en milieu glycériné.

L'augmentation des mêmes nombres se manifeste également quand, toutes choses égales d'ailleurs, on remplace dans le milieu de culture le phosphate monopotassique, qui a servi à préparer les précédents, par le phosphate dipotassique : un tel milieu est alors plus favorable à la vitalité et à l'activité du ferment, en raison de son acidité initiale moindre.

f) *Virulence*. — L'inoculation au cobaye, par voie sous-cutanée ou par voie intra-péritonéale, n'a pas été suivie de troubles manifestes dans la santé de l'animal : ce microbe ne paraît donc pas pathogène.

g) *Réaction à l'égard des sérums*. — *Agglutination*. — Le *Bacillus amaracrylus* peut être agglutiné dans certaines conditions.

1° Le sérum provenant d'animaux inoculés avec ce microbe l'agglutine facilement ;

2° Le sérum normal, humain ou animal, ne l'agglutine pas ou rarement et toujours très faiblement ;

3° Le sérum des typhiques et paratyphiques ne l'agglutine pas.

## B. — CARACTÈRES DES CULTURES DANS LES MILIEUX USUELS

### I. — Milieux artificiels.

#### a) LIQUIDES.

1° *Milieux d'origine organique, de nature animale*. — Le bacille se développe bien dans la plupart des liquides ordinairement employés en microbiologie. Outre les deux subs-



trata nutritifs mentionnés plus haut (milieu de Laurent peptoné, eau de levure glucosée alcalinisée), nous l'avons cultivé dans le mélange suivant, de composition analogue à celui employé par Pasteur dans ses expériences sur la fermentation du tartrate de chaux.

|                              |           |
|------------------------------|-----------|
| Sulfate d'ammoniaque .....   | o gr. 50  |
| Phosphate d'ammoniaque. .... | o gr. 40  |
| Phosphate de potasse.....    | o gr. 20  |
| Nitrate de potasse.....      | o gr. 20  |
| Sulfate de magnésie .....    | o gr. 10  |
| Peptone .....                | 2 gr. 50  |
| Eau .....                    | Un litre. |

Ce milieu nous a servi, en particulier, pour la recherche du pouvoir réducteur, dénitrifiant du bacille, et dont l'étude est développée dans ce qui suit.

CULTURES DANS LE BOUILLON. — *Bouillon ordinaire.* — Le développement est rapide à la température de 37°; au bout de six heures, on observe un trouble uniforme très net : en examinant la culture par transparence et après agitation, on aperçoit des ondes soyeuses, des stries à reflets chatoyants. Par repos, le liquide abandonne un sédiment pulvérulent blanc, sans formation de voile à la surface ni de flocons à l'intérieur. La culture demeure inodore et prend une réaction acide.

*Bouillon phéniqué.* — Ce bacille végète dans le bouillon peptoné et phéniqué à 1 p. 1000 et à la température de 42°; dès douze heures après l'ensemencement, le liquide peut être déjà louche. Il est à remarquer que dans ces conditions d'existence il subit des variations dans sa morphologie et sa motilité : ses articles deviennent plus courts et présentent parfois l'aspect de diplocoques; sa mobilité est aussi très réduite. Réensemencé dans les milieux ordinaires, il revêt son type habituel.

2° *Milieux d'origine organique, de nature végétale.* — Nous l'avons cultivé dans le bouillon de haricots préparé par décoction de ces graines dans la proportion de 5 à 6 p. 100; ce bouillon a été ensuite légèrement salé et sucré et très faiblement alcalinisé.

3° *Milieux d'origine minérale.* — Il s'accommode de liquides nutritifs minéraux dans lesquels on dissout la ma-

tière fermentescible : c'est ainsi qu'il se développe dans le milieu exclusivement minéral de Laurent, de composition

|                               |           |
|-------------------------------|-----------|
| Sulfate d'ammoniaque.....     | 4 gr. 70  |
| Phosphate monopotassique..... | 0 gr. 75  |
| Sulfate de magnésie.....      | 0 gr. 10  |
| Eau.....                      | Un litre. |

ne contenant comme azote que de l'azote ammoniacal et auquel on ajoute comme aliment carboné de la glycérine, ou plus généralement l'une des substances fermentescibles désignées dans ce qui suit et sur lesquelles le ferment exerce son action.

Cette faculté de vivre et de se développer dans ces milieux à azote purement minéral facilite beaucoup l'étude des diverses fonctions physiologiques du microbe à l'égard des substances qu'il est capable de modifier, car elle simplifie les opérations d'extraction des produits de transformation, toujours pénibles à effectuer dans des liqueurs ou résidus d'évaporation chargés de peptone ou autres produits azotés organiques alimentaires. Cet avantage est à joindre à celui que nous avons signalé plus haut et relatif à l'emploi d'un tel milieu pour l'isolement de l'espèce bactérienne que nous étudions.

De même, il se développe bien dans chacun des milieux suivants :

|                               |           |                             |           |
|-------------------------------|-----------|-----------------------------|-----------|
| Sulfate d'ammoniaque          | 4 gr. 70  | Sel de Seignette.....       | 5 gr.     |
| Phosphate monopotassique..... | 0 gr. 75  | Phosphate d'ammoniaque..... | 0 gr. 75  |
| Carbonate de magnésie         | 0 gr. 10  | Sulfate de magnésie.        | 0 gr. 10  |
| Glycérine.....                | 10 gr.    | Glycérine.....              | 10 gr.    |
| Eau ....                      | Un litre. | Eau ...                     | Un litre. |

où ses cultures accusent nettement la formation de l'acroleine.

Enfin, au chapitre de la *glycéro-réaction*, nous verrons que son développement et son pouvoir déshydratant à l'égard de la glycérine se réalisent même dans un milieu constitué par de l'eau potable simplement glycinée.

## b) SOLIDES.

### 1° Milieux d'origine organique, de nature animale.

GÉLATINE PEPTONE. — *En plaques.* — Nous rappelons que c'est par culture à la température de 20° sur plaques de géla-

tine peptone, ce merveilleux agent de séparation et d'isolement des espèces microbiennes, que nous avons obtenu des colonies pures du bacille et pu réaliser ainsi l'unicité de la semence dans nos cultures ultérieures. A ce sujet, nous mentionnons à nouveau que ce microbe rentre dans la catégorie des espèces *non liquéfiantes* et que ses colonies se développent au sein de la gélatine, au voisinage de la surface.

*En piqûre.* — En cinq à six jours, à la température de 20°, on observe un faible développement de petites colonies blanchâtres, arrondies en grains de chapelet le long de la piqûre ; à la surface, la culture se développe plus rapidement, en trois à quatre jours, et plus abondamment : elle s'étale en un disque étroit, blanc, granuleux, agrégat de petites colonies arrondies.

*En strie.* — Au bout de quarante-huit heures, à la température de 20°, on aperçoit déjà le long de la strie de très petites colonies granuleuses, blanchâtres, comparables à des grains de très fine semoule, restant toujours petites et par suite généralement isolées : la vitalité de la culture persiste pendant plusieurs semaines.

GÉLOSE PEPTONE. — *En plaques.* — A la température de 30°, le développement est assez rapide : en trois jours apparaissent les petites colonies blanchâtres qui se répartissent au sein de la plaque, mais de préférence dans la région superficielle.

*En piqûre ou en strie.* — Mêmes caractères que pour la culture sur gélatine, sauf que l'apparition des colonies est moins lente, en raison de la température optima, plus élevée, à laquelle on peut soumettre les essais.

GÉLATINE OU GÉLOSE PEPTONE GLYCÉRINÉE. — *En plaques, en piqûre ou en strie.* — Caractères analogues aux précédents : dans ces cultures, le réactif *protéique acide* permet parfois de reconnaître la formation d'acroléine ; pour cela, il suffit, par exemple, de remettre en solution aqueuse la gélatine de plusieurs plaques, de soumettre le liquide à la distillation et de faire agir le réactif sur le premier fractionnement du distillatum.

## 2° Milieux métalliques.

Sur gélose additionnée de sous-acétate de plomb à 1 p. 500, la culture ne noircit pas.



## II. — Milieux naturels.

a) DE NATURE ANIMALE. — *Lait*. — Ensemencé dans le lait, il s'y multiplie rapidement et le coagule par formation d'acide lactique.

*Sérum solidifié*. — Les colonies apparaissent assez vite à la température de 37° et présentent les caractères des colonies sur gélatine ou sur gélose.

b) DE NATURE VÉGÉTALE. — *Vin*. — Ainsi que nous le rapportons à la fin de l'étude du *Bacillus amaracrylus*, dans notre essai de reproduction de la maladie de l'amertume, ce bacille originaire d'un vin amer, ensemencé dans un vin sain, peut s'y développer et reproduire l'ensemble des caractères organoleptiques, chimiques et microscopiques observés au cours de cette maladie.

*Pomme de terre*. — Tous les essais n'ont donné qu'une culture minime, imperceptible.

*Pomme de terre glycinée*. — Il ne se produit pas de développement plus apparent. En raclant une petite région de la surface de la pomme de terre ensemencée avec une culture très diluée, et examinant au microscope, on reconnaît une multiplication microbienne.

## III. — Cultures dans les milieux colorés.

a) *En milieu* (bouillon, lait ou gélose) *tournesolé*, lactosé ou glucosé, la production d'acidité fait virer rapidement le tournesol au rouge.

b) *En milieu* peptoné, salé et glucosé, additionné de *rouge neutre*, le bacille produit lentement une réduction progressive de la matière colorante avec virage au rouge orangé, sans fluorescence nette.

c) *En milieu* d'*Endo* ou de *Drigalski*, il donne des colonies rouges.

## C. — CARACTÈRES BIOCHIMIQUES

### I. — Action sur les matières azotées.

1° ACTION SUR LES SUBSTANCES ALBUMINOÏDES. — Nous n'avons pas abordé l'étude de la fermentation des matières albuminoïdes dont la constitution est trop complexe et la nature chimique incomplètement connue. D'habitude, ces

substances à poids moléculaire élevé se désagrègent en un nombre relativement considérable de produits secondaires qui, eux-mêmes, ne sont pour la plupart que des corps intermédiaires et se résolvent à leur tour en éléments plus simples : en sorte que le processus d'une telle transformation échappe en partie à l'analyse.

Nous avons simplement utilisé les précieux avantages offerts au microbiologiste par les matières protéiques, telles que : la gélatine, comme agent de support et d'isolement des colonies microbiennes ; la peptone, qui joue en bactériologie non seulement le rôle d'aliment, mais encore celui de réactif pour la reconnaissance de la formation d'indol par les bactéries ; le lait, pour l'épreuve de sa coagulation ; le blanc d'œuf cuit pour la reconnaissance des enzymes protéolytiques.

D'ailleurs, ce bacille ne paraît pas avoir d'action bien marquée sur les matières albuminoïdes. Nous avons déjà signalé qu'il ne liquéfie pas la gélatine ; la caséine du lait est coagulée par formation d'acide lactique, mais elle ne semble pas autrement modifiée ; l'albumine de l'œuf demeure intacte : il ne secrète donc pas de ferments protéolytiques, pepsine ou trypsine.

a) *Recherche de l'indol.* — Pour cette recherche, nous avons employé les deux milieux de culture suivants :

|                        |           |                      |           |
|------------------------|-----------|----------------------|-----------|
| Phosphate de potase..  | 0 gr. 75  | Peptone Chapoteaut . | 30 gr.    |
| Sulfate de magnésie .. | 0 gr. 10  | Eau.....             | Un litre. |
| Peptone Chapoteaut ..  | 20 gr.    |                      |           |
| Eau.....               | Un litre. |                      |           |

Après ensemencement et développement à l'étuve à 37°, pendant au moins quarante-huit heures, les principales méthodes habituellement employées pour caractériser l'indol ont donné des résultats négatifs : même en utilisant des cultures âgées d'un mois et en soumettant le liquide à la distillation, pour que l'indol, volatil, entraînable par la vapeur d'eau passant dans le distillat, on puisse opérer sur une solution plus concentrée. Parmi ces méthodes, nous avons employé les suivantes :

1° Celle qui met en œuvre la réaction *indol-nitreuse*, basée sur la propriété signalée par Salkowsky, que possède l'indol, dissous dans l'eau, de donner une coloration rouge sang,

rouge vineux ou simplement rosée, en présence de l'acide azoteux, par formation de *nitroso-indol*  $C^8H^6-N-N=O$  ; et dont voici la technique opératoire :

A un volume d'environ 10 centimètres cubes de culture, on ajoute X gouttes d'une solution de nitrite de potasse ou de soude à 0.02 pour cent, et XX à XXX gouttes d'acide sulfurique pur. S'il y a de l'indol, on obtient une coloration rouge groseille plus ou moins intense. Dans le cas où la réaction manque de netteté, par exemple lorsqu'il ne se produit qu'une coloration rosée, on ajoute quelques centimètres cubes d'alcool amylique et on agite : l'alcool amylique se sépare par le repos en entraînant le dérivé nitrosé et le met nettement en évidence.

2° Celle d'Ehrlich, fondée sur la propriété qu'a l'indol en solution aqueuse de donner une coloration rouge avec la diméthylamido-benzaldéhyde, plus sensible encore que la précédente, et dont la sensibilité est également augmentée par l'addition d'alcool amylique qui provoque en la rassemblant la concentration de la matière colorante rouge.

3° Nous avons aussi contrôlé ces résultats en appliquant au distillatum notre réaction *indol-formol nitreuse* (1), basée sur la coloration violette fournie par l'indol et les matières albuminoïdes en présence de formaldéhyde et sous l'action de l'acide chlorhydrique nitreux.

b) *Recherche de l'ammoniaque.* — Par contre, dans ces cultures anciennes, ou même dans d'autres plus jeunes, le réactif de Nessler donne toujours une coloration jaune plus ou moins intense, vraisemblablement due à la formation d'ammoniaque ; vérification ayant été faite avant l'ensemencement et à l'aide du même réactif de l'absence de ce composé dans le milieu nutritif.

Pour obtenir plus de précision, nous avons complété cette expérience directe et rapide, par la suivante indirecte et plus longue, en distillant au préalable le liquide de culture en présence d'une petite quantité de magnésie récemment calcinée, à l'aide de l'appareil de Schlösing-Aubin et recueillant la solution aqueuse condensée dans un verre contenant X gouttes d'acide sulfurique au dixième ; après l'opération, la présence de l'ammoniaque dans la liqueur acide est alors nettement accusée par le réactif de Nessler ; elle peut même être révélée par l'expérience classique : ébulli-

(1) E. VOISENET. — *Bull. Soc. Chim.*, t. 33, p. 1207 ; 1905.



tion après addition d'un léger excès de potasse et reconnaissance de l'alcali volatil par l'odorat et le papier rouge de tournesol.

Les quantités d'ammoniaque ainsi présentes sont toujours minimales : le dosage de cette base dans trois cultures âgées d'environ un mois nous a donné comme moyenne 3 mgr. 6, en  $\text{NH}_3$ , par litre.

## 2° ACTION SUR LES NITRATES :

a) *Recherche des nitrites.* — Le ferment a été ensemencé dans un milieu renfermant une petite proportion de nitrate de potasse et de composition décrite plus haut : après cinq jours à l'étuve à  $37^\circ$ , une prise d'essai de liquide additionnée de réactif de Trommsdorff et d'une goutte d'acide sulfurique pur, donne immédiatement une coloration bleue révélant la présence de l'acide azoteux ; présence également affirmée par le réactif de Griess ou par la réaction à la métaphénylène-diamine.

b) *Estimation du pouvoir dénitrifiant. Recherche de l'azote.* — Le bacille ensemencé dans les deux milieux suivants :

|                        |     |                        |     |
|------------------------|-----|------------------------|-----|
| Peptone .....          | I   | Nitrate de potasse pur | I   |
| Nitrate de potasse pur | I   | Bouillon ordinaire.... | 100 |
| Eau distillée .....    | 100 |                        |     |

placés à l'étuve à  $37^\circ$ , produit dans chacun d'eux la transformation partielle du nitrate en nitrite. Après une semaine de culture, le dosage du nitrite formé dans la solution de peptone nitratée nous a donné 0 gr. 046, soit 4,6 de nitrite pour 100 de nitrate.

*Recherche de l'azote.* — En opérant avec des tubes complètement remplis de chacun des deux milieux précédents et renversés sur le mercure, ou mieux suivant la technique de Grimbert, nous avons reconnu que dans la culture peptonée il ne se produit pas de dégagement gazeux sensible, si ce n'est une trace d'acide carbonique provenant de la combustion du carbone alimentaire de la peptone : au contraire, dans la culture en bouillon, il s'établit modérément un léger dégagement gazeux s'arrêtant au bout de quelques jours, et qui est constitué par une faible quantité d'acide carbonique, absorbable par la potasse, et par de l'azote.

Cette recherche nous a été inspirée par celles antérieures et analogues de MM. Hugounenq et Doyon (1), et de M. Grimbert (2), relatives à l'action sur les nitrates, du *colibacille* et du bacille *typhique*, avec mise en liberté d'azote dans les cultures en bouillon ordinaire. D'après ce dernier auteur, cette libération d'azote serait corrélative de la présence de matériaux amidés dans la culture et résulterait de l'action secondaire exercée sur ces substances par l'*acide nitreux* formé par ces microbes.

Le *Bacillus amaracrylus* apparaît donc, et suivant la convention de Grimbert, comme un *ferment dénitrifiant indirect*, au même titre que les bacilles d'*Escherisch* et d'*Eberth*. Toutefois, l'analyse quantitative comparative de l'azote libéré montre que son *pouvoir dénitrifiant* n'est pas aussi énergique. De plus, à l'inverse de ces derniers, il ne nous a pas donné de dégagement d'azote dans le bouillon additionné de nitrite de potasse, à titre convenable, par exemple, 0,1 ou 0,2 de nitrite pour 100. Enfin, dans ces conditions de culture, il paraît plus sensible à l'action toxique des nitrites que les microbes susnommés.

### 3° ACTION SUR L'URÉE :

Le bacille ensemencé dans le milieu suivant employé par Miquel dans son remarquable travail sur les urobactéries,

|                         |     |
|-------------------------|-----|
| Urée .....              | 2   |
| Peptone .....           | 1   |
| Eau distillée . . . . . | 100 |

ne produit pas la transformation de la carbamide en carbonate d'ammoniaque : il ne secrète donc pas d'uréase.

## II. — Action sur les alcools polyatomiques et les hydrates de carbone.

a) *Substances fermentescibles par le bacille.* — Le *Bacillus amaracrylus* fait fermenter des alcools polyatomiques et des hydrates de carbone, tels que : la glycérine, la mannite ; le glucose, le lévulose, le galactose, le sucre interverti ;

(1) L. HUGOULENQ et M. DOYON. — *Comptes rendus de la Société de biologie*, t. 4, p. 198 ; 1897 : t. 5, p. 635 et 835 ; 1898. — *Archives de physiologie*, p. 390 et 698 ; 1898. — *Annales de Chimie et de physique*, t. 15, p. 151 ; 1898.

(2) L. GRIMBERT. — *Comptes rendus de la Société de biologie*, t. 5, p. 385, 657, 1134 et 1135 ; 1898. — *Annales de l'Institut Pasteur*, t. 13, p. 67 ; 1899.

le saccharose, le lactose, le maltose. Les transformations de ces substances s'effectuent même en milieu purement minéral, ne contenant comme carbone alimentaire que celui de la matière fermentescible et comme azote, que de l'azote ammoniacal : toujours limitées en l'absence d'un agent neutralisateur de l'acidité engendrée, elles peuvent devenir totales si l'on a introduit au préalable dans le vase à fermentation un excès de carbonate de chaux.

Dans ces milieux minéraux, le ferment qui consomme facilement la mannite, n'agit pas sur l'alcool hexatomique voisin, la dulcite, ni sur l'alcool tétratomique, l'érythrite : cependant, en milieu rendu plus nutritif par addition de peptone, ces substances subissent un commencement de fermentation.

En ce qui concerne les polysaccharides, le bacille n'agit que modérément sur la dextrine et demeure inactif vis-à-vis de l'amidon.

Dans ce qui suit, nous allons étudier qualitativement et quantitativement l'action du bacille sur chacune des substances précédentes qu'il est capable de transformer : aussi, dans cette partie du plan d'une marche méthodique, en vue de la détermination de ses propriétés biochimiques, nous nous bornerons à mentionner qu'il fournit invariablement, avec chacune de ces substances, de l'acide lactique, et à rappeler qu'il transforme la glycérine avec production d'acroléine. La première de ces propriétés permet de le considérer, en général, comme un *ferment lactique* : la seconde en fait, en particulier, un *ferment déshydratant*.

b) *Production de gaz*. — Parmi les gaz dégagés au cours des fermentations des alcools polyatomiques et des hydrates de carbone, nous n'avons reconnu que l'hydrogène et l'acide carbonique ; le premier de ces gaz figurant pour plus de la moitié et moins des deux tiers dans le volume total du mélange gazeux.

### III. — Action sur certains sels organiques.

A ce point de vue, nous n'avons envisagé que l'action sur le tartrate acide de potasse, le tartrate neutre de potasse, le sel de Seignette et le tartrate de chaux.

Le *Bacillus amaracrylus* consomme-t-il la crème de tartre ?



Cette question se pose naturellement à la suite des résultats contradictoires observés à ce sujet par Pasteur (1), Glenard et de Vergnette-Lamothé.

Dans une première recherche, Pasteur constate que le ferment de l'amertume n'agit pas sur la crème de tartre, au moins pour un vin donné et dans le début de la maladie ; les dosages comparatifs de l'acide tartrique de ce vin récemment *amer* et du même vin *sain*, lui fournissent exactement le même résultat : ultérieurement, en effectuant à nouveau cette comparaison sur le même vin, à maladie *avancée*, il reconnaît une diminution de l'acide tartrique voisine du quart seulement de la quantité initiale.

Au contraire, Glenard, exécutant la même analyse sur un vin *tourné à l'amer*, suivant l'expression des dégustateurs, à maladie relativement *récente*, n'y trouve plus de tartre, tandis que le vin qui commençait à s'altérer en renfermait 2 gr. 7 par litre.

Enfin, de Vergnette-Lamothé, dans une lettre à Pasteur sur l'amertume des vins, énonce que dans cette maladie le tartre est décomposé.

Pour répondre à la question ainsi posée, nous avons effectué une série d'essais dont le détail et les résultats ont été consignés dans un mémoire publié antérieurement (2), et que nous reproduirons à sa vraie place, dans notre travail déjà annoncé, sur la maladie de l'amertume des vins.

Nous nous bornerons simplement ici à faire connaître que le *Bacillus amaracrylus*, isolé d'un vin amer, capable de reproduire la maladie de l'amertume dans d'autres vins, avec ses caractères organoleptiques, microscopiques et chimiques, consommant les sucres et la glycérine de ces liquides, reste complètement *inactif*, dans les conditions de nos expériences, vis-à-vis de la crème de tartre.

Dans les mêmes circonstances, il n'utilise pas davantage le carbone alimentaire qui lui est offert par l'acide tartrique dans ses sels neutres.

Tels sont, dans leur ensemble, les principaux caractères morphologiques, biologiques, cultureux et biochimiques du *Bacillus amaracrylus*.

(1) PASTEUR. — *Etudes sur le vin*, 2<sup>e</sup> édition, p. 272, 276 et 321.

(2) E. VOISENET. — *Le Bacillus amaracrylus consomme-t-il la crème de tartre ?* Comptes rendus, Acad. des Sc., t. 156, p. 1410; 1913.

## Fermentation de la Glycérine.

*Expérience préliminaire.* — Après que nous eûmes reconnu la présence de l'acroléine dans les vins amers et son absence dans les vins sains ou atteints de maladies différentes, estimant que cette substance devait provenir de la déshydratation de la glycérine par un ferment unique normalement contenu dans ces liquides, notre première expérience fut de cultiver tout aussitôt le bacille de l'amertume en milieu glyciné afin d'essayer de reproduire, en dehors du vin, la même transformation.

Cette culture initiale fut faite avec le milieu de Laurent peptoné et glyciné à 10 gr. par litre,ensemencé avec un ferment prélevé dans un vin amer et purifié par des réensemencements successifs dans le milieu précédent. Une telle méthode est assurément imparfaite, en ce qu'elle ne garantit la pureté de l'espèce que par le criterium de l'inspection microscopique ; aussi l'avons-nous abandonnée dans la suite de cette étude : nous avons cependant tenu à la reproduire ici, d'une part, pour rester fidèle à l'esprit de suite qui nous a guidé au cours de ces recherches, d'autre part et surtout, parce que, même avec son imperfection, elle nous a fourni immédiatement et d'une façon indubitable la preuve de la *transformation bactérienne de la glycérine en acroléine*, transformation rendue seulement très vraisemblable par la naissance de cet aldéhyde dans un milieu complexe comme le vin, dont on ne peut dire que tous les constituants sont actuellement déterminés.

Il ne faut pas oublier aussi le caractère préliminaire de cette expérience, faite non pas pour étudier à fond la fonction physiologique d'un ferment à l'égard de la glycérine, mais simplement pour s'assurer rapidement de la dégradation de cette substance en son produit de déshydratation : simplification moléculaire qui ne pouvait déjà guère être considérée comme l'œuvre d'une association microbienne.

En fait, cette expérience est doublement intéressante : elle est la reproduction artificielle d'un phénomène évoluant naturellement dans les vins qui tournent à l'amer : de plus, l'acroléine figurant en priorité comme aldéhyde dans le liquide de fermentation, peut être caractérisée à l'aide de réactions inapplicables à cette substance contenue dans un

distillatum retiré des vins, à cause du voisinage de corps à même fonction, notamment l'aldéhyde éthylique.

Le liquide ayant été placé à l'étuve, nous avons suivi le développement de la culture à la température de 25° à 30°. Au bout de deux à trois jours, nous avons reconnu qu'elle était le siège d'un dégagement gazeux par l'apparition de fines bulles au sommet du flacon : à ce moment nous avons traité une prise de la liqueur par le réactif *albumine-acide chlorhydrique nitreux* en suivant la technique précédemment indiquée : en renouvelant cette épreuve à intervalles répétés, nous avons obtenu vers le quatrième jour la coloration vert bleuâtre due à l'acroléine. Il est à remarquer, et nous devons l'indiquer dès à présent, que dans la succession de ces essais on peut obtenir soit avant, soit même après la mise en évidence de l'aldéhyde acrylique, des colorations diverses dont la teinte varie du rose violacé au bleu violacé, colorations dont nous chercherons à interpréter la formation dans notre étude de la fonction physiologique du ferment à l'égard de la glycérine. Nous devons mentionner aussi que l'époque de constatation de la présence de l'acroléine est variable, toutes choses égales d'ailleurs, suivant la générosité de l'ensemencement et la qualité du ferment, mais qu'elle reste comprise dans la durée maxima d'une semaine. Enfin, cette expérience effectuée suivant la technique de la *glycéro-réaction* décrite dans la seconde partie de ce travail, conduit encore plus sûrement au résultat.

La présence de l'aldéhyde acrylique nous ayant été ainsi révélée par l'action *directe* du réactif *protéique acide* sur le liquide de culture, celui-ci fut aussitôt soumis à la distillation au tube Le Bel et Henninger : cette opération donna un premier fractionnement déjà très irritant pour les muqueuses nasale et surtout lacrymale, cette dernière paraissant encore plus sensible à l'action de l'acroléine. En opérant sur cinq litres de culture, nous obtinmes par ces rectifications successives dans les boules du tube qui constituent autant de chambres de distillation, un fractionnement de 100<sup>cc</sup> satisfaisant aux réactions précédemment indiquées pour l'acroléine, fournissant en particulier et *a fortiori* la coloration *vert-bleu* avec le réactif *protéique acide*.

Nous avons en outre soumis ce distillatum aux essais suivants dont les quatre premiers caractérisent la fonction

aldéhyde et dont les autres permettent de reconnaître son représentant acrylique.

*Action sur le bisulfite de rosaniline.* — Recoloration instantanée à froid.

*Action sur le nitrate d'argent ammoniacal.* — Réduction immédiate à chaud.

*Action sur la liqueur de Fehling.* — Réduction à chaud.

*Action sur le réactif de Nessler.* — Réduction lente à froid sous forme d'un précipité gris brunâtre.

*Réaction colorée de la dioxyacétone.* — Le liquide saturé d'eau de brome, puis traité à froid par l'eau de baryte dont on élimine l'excès par l'acide carbonique, fournit après concentration les réactions colorées de la dioxyacétone indiquées par Denigès (1), avec la codéine, la résorcine, le thymol, le  $\beta$ -naphтол. Dans les mêmes conditions, l'acroléine, corps non saturé, fixe le brome pour donner le dibromure d'acroléine que l'eau de baryte transforme par hydrolyse en un mélange d'aldéhyde glycérique et de dioxyacétone (2) (Fischer et Tafel).

*Réaction de Lewin* (3). — Lorsqu'on mélange de la pipéridine à une solution de nitroprussiate de sodium et qu'on y ajoute de l'acroléine, on obtient une coloration bleu-gentiane, devenant violette par l'ammoniaque, violet-rose par la soude, vert-bleu par l'acide acétique, brun-rouille par un acide minéral, brun sale par l'eau oxygénée.

Le liquide précédent se comporte à l'égard de cette réaction comme une solution aqueuse d'acroléine.

Il est à remarquer que l'aldéhyde acétique donne dans les mêmes conditions une coloration analogue, également très sensible : aussi la réaction de Lewin ne peut-elle servir à caractériser l'acroléine dans le distillatum retiré des vins amers.

Au cours de cette fermentation il se produisit un dégagement gazeux que nous reconnûmes comme formé d'hydrogène et d'anhydride carbonique : le liquide devint franchement acide ; il ne dégagait pas, même à chaud, l'odeur d'acide butyrique et ne prit aucun goût amer.

(1) DENIGÈS. — Comptes rendus, Académie. des Sciences, t. 148, p. 172 ; 1909.

(2) E. FISCHER et TAFEL. — Ber. der Deutsch. Chem. Ges., t. 20, p. 3388 ; 1887.

(3) LEWIN. — Ber. der Deutsch. Chem. Ges., t. 32, p. 3388 ; 1899.



Nous devons ajouter que des cultures comparatives additionnées de glucose, de lévulose, de mannite, de crème de tartre ou d'acide lactique, au lieu et place de la glycérine, ne nous donnèrent aucune trace d'aldéhyde acrylique.

La formation d'acroléine dans les vins amers et la reproduction directe de cette réaction microbienne à partir de la glycérine, confirment donc la préférence marquée pour cette substance du ferment de l'amertume.

Les résultats intéressants de cette expérience préliminaire étant enregistrés, il restait à vérifier que l'espèce *pure*, isolée et décrite précédemment sous le nom de *Bacillus amaracrylus*, se comporte de même vis-à-vis de la glycérine, et à poursuivre l'étude des diverses particularités de cette fermentation.

Le bacille pouvant végéter dans des liquides nutritifs ne contenant comme aliment organique que la substance fermentescible, nous avons fait cette étude, à la fois en milieu peptoné et en milieu non peptoné, en l'absence ou en présence de carbonate de chaux.

### Fermentation de la Glycérine

EN MILIEU PEPTONÉ, SANS ADDITION DE CARBONATE DE CHAUX

L'espèce pure a été ensemencée dans le milieu de Laurent additionné de peptone et de glycérine, chacune de ces substances y entrant à la dose de 10 grammes par litre, et préalablement stérilisé. Le mélange contenu dans des flacons de un litre, pleins et munis d'un tube abducteur, a été placé à l'étuve à 30°; l'extrémité des tubes débouchant dans une cuve à mercure et étant recouverte d'une éprouvette graduée, en vue de la mesure du dégagement gazeux. Les conditions ainsi imposées à nos cultures les plaçaient, au bout de quelques jours, sinon de quelques heures, à l'abri de l'oxygène libre, les flacons étant fermés avec de bons bouchons en caoutchouc, portant des tubes de dégagement se rendant sous le mercure, étanchéité encore complétée par le paraffinage des bouchons et des goulots des flacons. Aussi, en raison du développement du ferment dans ce milieu clos, observe-t-on une légère absorption dans le tube pendant les deux premiers jours, époque de son existence

en vie aérobie et de sa multiplication la plus intense, la température et la pression extérieures étant demeurées invariables.

Le liquide primitivement limpide et à peine acide, devient rapidement trouble avec augmentation progressive de son acidité, en même temps qu'il se produit un dégagement gazeux se continuant modérément pendant quelques jours. Un mois après l'ensemencement nous avons procédé à l'étude des résultats de la fermentation.

#### ANALYSE DES GAZ

Le dégagement gazeux est constitué par un mélange d'hydrogène et d'anhydride carbonique, sans autre gaz : en effet, il est absorbable partiellement par la potasse et ni le liquide d'absorption ni l'atmosphère primitive du mélange gazeux ne brunissent un papier imprégné d'un sel de plomb ; le gaz résiduel brûle avec une flamme pâle et de plus sa combustion dans l'eudiomètre le fait reconnaître pour de l'hydrogène pur. Ce dernier gaz se dégage à peu près seul, surtout au début, l'anhydride carbonique restant dissous, en sorte que le dégagement gazeux n'aura pas la composition du mélange effectivement produit par le bacille.

L'analyse du dégagement a été faite successivement avec les divers fractionnements recueillis par périodes de vingt-quatre heures, sauf pour le dernier comprenant plusieurs jours, en mesurant le volume de chacun d'eux, absorbant l'acide carbonique par la potasse et évaluant l'hydrogène résiduel. La même méthode a été appliquée au dosage des gaz dissous, après leur extraction par l'ébullition du liquide à fermentation terminée.

*Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures et gaz dissous, par litre de culture :*

|                                        | Volume            | CO <sup>2</sup>   | H                 |
|----------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 <sup>er</sup> fractionnement.....    | 32 <sup>cc</sup>  | 3 <sup>cc</sup>   | 29 <sup>cc</sup>  |
| 2 <sup>e</sup> — .....                 | 64                | 11                | 53                |
| 3 <sup>e</sup> — .....                 | 65                | 12                | 53                |
| 4 <sup>e</sup> — .....                 | 52                | 10                | 42                |
| 5 <sup>e</sup> — (durée: 4 jours)..... | 18                | 4                 | 14                |
| Total des gaz dégagés.....             | 231 <sup>cc</sup> | 40 <sup>cc</sup>  | 191 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous.....                       | 125 <sup>cc</sup> | 112 <sup>cc</sup> | 13 <sup>cc</sup>  |
| Gaz engendrés, par litre de culture    | 356 <sup>cc</sup> | 152 <sup>cc</sup> | 204 <sup>cc</sup> |

## ANALYSE DU LIQUIDE

Le milieu de culture possède une odeur et une saveur légères de peptone altérée, sans aucun goût amer : il présente une réaction nettement acide.

*Proportion de glycérine consommée.* — La glycérine non transformée contenue dans le liquide fermenté a été dosée à l'aide des deux méthodes suivantes, et en opérant chaque fois par comparaison avec un liquide témoin non fermenté, de composition identique à celle du milieu de culture.

*Extraction à l'alcool-éther.* — On évapore à la température de 70°, 100<sup>cc</sup> de liquide, jusqu'à réduction au tiers ; on ajoute un excès d'hydrate de baryte, on filtre et on évapore la liqueur dans le vide après addition de sable. Le résidu desséché est épuisé par un mélange à volumes égaux d'alcool absolu et d'éther anhydre : la solution recueillie dans une capsule tarée est abandonnée d'abord à l'évaporation spontanée, opération que l'on continue à température tiède ; le résidu est maintenu pendant trois jours dans le vide au-dessus de l'acide sulfurique et pesé ensuite.

*Extraction à l'éther acétique.* — On évapore au bain-marie à 70° environ, 100<sup>cc</sup> de liquide jusqu'à dessiccation complète. Le résidu froid est broyé avec 5 gr. de chaux vive ; la poudre ainsi obtenue est vivement agitée pendant quelques minutes dans un flacon contenant 50<sup>cc</sup> d'éther acétique pur et sec. On filtre en décantant et l'on recommence une seconde fois l'opération ; on repasse sur le filtre les premières portions du liquide qui peuvent avoir entraîné un peu de chaux : dans ces conditions la glycérine a été totalement dissoute. Le liquide recueilli dans une capsule tarée est évaporé d'abord au bain-marie pour séparer la majeure partie de l'éther acétique, puis l'extrait est pesé après dessiccation à l'étuve à 70° jusqu'à poids constant.

Dans chacun de ces essais, l'extrait final obtenu est constitué presque uniquement par de la glycérine mélangée à une trace de glycol triméthylénique. En tenant compte de la production moyenne de ce corps, évaluée dans les fermentations complètes qui suivent à 1 p. 10 de la glycérine transformée et après déduction de son poids calculé proportionnellement à celui de chacun des extraits, nous avons trouvé comme quantité moyenne de glycérine consommée, la proportion de 23.75 pour cent.

### Etude de l'acidité.

ACIDITÉ TOTALE.—Elle équivaut à 0 gr. 85 d'acide acétique par litre de culture, soit à 35 gr. 78 de cet acide pour 100 gr. de glycérine transformée.

Nous l'avons mesurée par une opération acidimétrique, soit avec l'eau de chaux en présence de phtaléine, soit avec l'eau de chaux seule, sans réactif indicateur, en opérant sur le liquide convenablement filtré et en estimant la neutralisation par l'apparition d'un très léger précipité dû à la formation de phosphate de chaux. Pour cette évaluation nous avons encore opéré par comparaison avec un échantillon du même liquide non fermenté, afin de tenir compte de la correction due à la faible acidité primitive du milieu de culture et attribuable à la fois au phosphate monopotassique et à la peptone.

#### ACIDITÉ VOLATILE

Le liquide de fermentation provenant de dix litres de culture a été distillé, d'abord directement et jusqu'à réduction au cinquième, c'est-à-dire à deux litres, ensuite dans un courant de vapeur d'eau en maintenant le volume invariable et jusqu'à obtention d'un volume de distillatum quintuple de celui du liquide resté dans le ballon après la première partie de l'opération, c'est-à-dire de dix litres : le résidu est mis à part pour la recherche des acides fixes.

Le liquide distillé du début exhale une très faible odeur d'acroléine, perceptible surtout au commencement de la condensation des vapeurs dans le tube du réfrigérant à l'extrémité duquel on expose les muqueuses du nez et des yeux. Chacun des deux fractionnements obtenus est trouble, opalescent, signe qu'il contient au moins un produit volatil insoluble dans l'eau, alcool, acide supérieur ou substance d'excrétion du bacille. Le volume total saturé par l'eau de baryte, jusqu'à réaction légèrement alcaline, est évaporé d'abord par distillation jusqu'à réduction à moitié, afin de pouvoir procéder à la recherche des alcools dans le liquide condensé, puis au bain-marie : il donne un résidu d'où les acides volatils sont extraits à nouveau par distillation en présence d'acide phosphorique, vérifié exempt de produits nitreux (1). L'opération a été conduite très lentement, en

(1) Pour cette extraction, nous avons employé aussi les acides tartrique et oxalique.



chauffant à douce flamme, dans un tout petit appareil distillatoire muni d'un réfrigérant bien alimenté par un courant d'eau froide; les acides volatils ont été entraînés par un courant de vapeur d'eau : pour un volume traité d'environ 40<sup>cc</sup>, nous avons recueilli 200<sup>cc</sup> de distillatum.

La liqueur acide obtenue est opalescente et exhale une légère odeur sudorale : elle contient, par ordre de grandeur décroissante, les acides *acétique*, *formique*, *acrylique* et des traces d'au moins un acide supérieur insoluble ou très peu soluble dans l'eau, acidité supérieure que nous estimons surtout être représentée par de l'*acide caprylique* en raison de caractères analytiques qui seront ultérieurement donnés.

Dans ce cas particulier, comme dans tous les exemples analogues de nos fermentations s'effectuant en l'absence de carbonate de chaux, et par suite très incomplètes, nous négligerons dans nos résultats cette trace d'acidité insoluble, et nous n'en tiendrons compte que dans les fermentations plus avancées ou totales effectuées en milieu maintenu constamment neutre par addition de craie : dans ces conditions, cette acidité insoluble se trouvant sensiblement plus élevée sera plus facilement appréciable : c'est ainsi que nous pourrions reconnaître comme élément essentiel de cette acidité, l'acide caprylique. Est-ce à dire que nous pourrions la doser? Non pas précisément, au moins en totalité; car le mot *insoluble* n'a ici qu'une valeur très relative, l'acide caprylique lui-même étant très légèrement soluble dans l'eau ou dans une solution aqueuse d'autres acides organiques; mais nous pourrions toujours évaluer la portion de cette acidité pratiquement insoluble dans les conditions de l'expérience, c'est-à-dire celle qui sera retenue par filtration et qui en est la partie principale.

Cette comptabilité nous sera d'ailleurs nécessaire, en particulier lorsque nous tenterons d'établir, sinon le bilan total d'une fermentation, au moins une comparaison quantitative entre les gaz dégagés et les différents produits simultanément engendrés.

Le volume total de 200<sup>cc</sup> a été divisé en deux parts égales : l'une devant servir à l'analyse qualitative des acides volatils, l'autre à leur analyse quantitative.

*Analyse qualitative des acides volatils.*

En se fondant sur les différences des points d'ébullition des acides précédents, qui sont respectivement et par ordre de grandeur : acide *formique*,  $100^{\circ}8$  ; acide *acétique*,  $118^{\circ}$  ; acide *acrylique*,  $140^{\circ}$ , on peut espérer obtenir par distillation fractionnée d'une solution aqueuse de leur mélange une séparation approchée au moins suffisante pour faciliter la reconnaissance de chacun d'eux : c'est en effet ce que l'expérience vérifie.

Dans une telle opération, l'acide acrylique, bien qu'étant le moins volatil des trois, possède la plus grande vitesse d'entraînement par la vapeur d'eau et domine par conséquent dans le premier distillatum, où on devra le rechercher ; tandis que les deux autres, formique et acétique, et surtout le premier, se concentrent dans le résidu de distillation.

En effectuant cette opération avec l'appareil de Duclaux pour la séparation des acides volatils, on pourra donc obtenir un premier fractionnement renfermant la majeure partie de l'acide acrylique ; un second, où dominera l'acide acétique : on arrêtera la distillation à ce moment et on conservera comme troisième fractionnement le liquide résiduel du ballon constitué surtout par une solution aqueuse d'acide formique.

La grandeur de chacun de ces fractionnements devra être autant que possible proportionnée à la quantité de chacun des acides que le mélange est supposé contenir, quantités qui auront été approximativement évaluées par un essai préliminaire. En fait, dans notre recherche actuelle, portant sur un volume de  $100^{\text{cc}}$ , nous avons arrêté le premier fractionnement au volume de  $15^{\text{cc}}$ , le second au volume de  $60^{\text{cc}}$  et, par suite, le troisième au volume de 25 centimètres cubes.

Très souvent même, pour cette reconnaissance des acides volatils, nous n'avons pas eu recours à cette séparation approchée par distillation fractionnée et nous avons opéré directement sur le distillatum primitif formant leur mélange, notamment en ce qui concerne les acides formique et acétique qui sont des plus commodes à caractériser.

*Recherche de l'acide formique.* — La reconnaissance de cet acide est facilitée par ses propriétés réductrices qui en font un corps à part dans le groupe des acides de la série acétique et suffisent à le caractériser en l'absence d'autres corps réducteurs et notamment de composés aldéhydiques.

1° Une partie du mélange des acides volatils ou mieux du troisième fractionnement qui résulte de sa distillation est traitée, soit directement, soit après neutralisation exacte avec la soude, par une solution d'azotate d'argent : il se forme un léger louche blanc devenant bientôt gris foncé, surtout à chaud, avec séparation d'argent métallique.

2° Une seconde portion des mêmes liquides est additionnée d'une solution de bichlorure de mercure et soumise à l'action de la chaleur : bien avant que le mélange commence à entrer en ébullition, et dès la température de 70°, si l'on opère au bain-marie, il y a production d'un louche blanc de protochlorure de mercure qui se rassemble rapidement en un faible précipité au fond du tube : ce dépôt examiné au microscope est cristallin et les cristaux présentent l'aspect de croix de Malte très nettes. En remplaçant dans cette réaction le bichlorure de mercure par une solution de sulfate mercurique en liqueur acidulée par l'acide sulfurique, on obtient de même un précipité de sulfate mercurieux formé de groupements cristallins rappelant une arête de poisson ou une feuille de fougère.

Le mélange des acides volatils ne renfermant pas d'autre acide réducteur, ni d'aldéhydes, pas même de l'acroléine, ces deux réactions suffisent à la reconnaissance de l'acide formique.

*Recherche de l'acide acétique.* — Cet acide a été mis en évidence par les réactions suivantes :

1° Le mélange des acides volatils et surtout le deuxième fractionnement provenant de sa distillation, porté à l'ébullition dégage une odeur caractéristique d'acide acétique.

2° En ajoutant à 10<sup>cc</sup> de ce second fractionnement trois gouttes d'alcool et dix gouttes d'acide sulfurique, puis chauffant au bain-marie bouillant, le mélange exhale l'odeur agréable et spéciale de l'éther acétique.

3° En neutralisant 10<sup>cc</sup> de ce fractionnement par la soude, le liquide additionné d'une trace d'anhydride arsénieux et évaporé à sec fournit un résidu dont une calcination légère dégage des fumées blanches à odeur infecte de cacodyle.

4° L'acide acétique a été en outre caractérisé par la réaction également classique fondée sur la production d'acétate de peroxyde de fer et sur les propriétés particulières de cette combinaison tenant à son instabilité.

Comme cette réaction est commune aux acides acétique et formique,

nous avons dû tout d'abord éliminer les traces de ce dernier, séparation que nous avons effectuée par les deux procédés suivants :

a) Une partie de la solution primitive ou du deuxième fractionnement est chauffée avec du bioxyde de mercure en léger excès; l'acide formique réduit cet oxyde tout en se décomposant lui-même, tandis que l'acide acétique reste en dissolution, combiné à l'état d'acétate mercurique : on sépare par filtration.

b) Une autre portion du mélange acide ou du second fractionnement est introduite dans un petit ballon muni d'un réfrigérant ascendant, avec un égal volume d'une solution de bichromate de potasse et d'acide sulfurique ainsi composée : bichromate de potasse, 12 gr. ; eau, 100 cent. cubes ; acide sulfurique concentré, 30 cent. cubes. On porte à l'ébullition pendant une dizaine de minutes ; l'acide formique est alors complètement brûlé et transformé en acide carbonique et en eau : l'acide acétique reste inaltéré et est retiré ensuite par distillation au réfrigérant descendant.

Il est nécessaire d'indiquer que dans cette réaction de destruction de l'acide formique avec conservation de la molécule acétique, l'acide acrylique lui-même est transformé, mais sans production d'acide acétique.

En ajoutant du perchlorure de fer au distillat ainsi purifié et neutralisant presque avec de l'ammoniaque, ou en mélangeant la liqueur mercurique précédente avec le même réactif, nous avons obtenu deux solutions colorées en rouge foncé, se décolorant par l'ébullition, en même temps qu'il se précipite des flocons jaunes rougeâtres ; après avoir maintenu quelque temps cette action de la chaleur, la filtration donne deux liqueurs incolores, ne contenant plus de fer en dissolution, même décelable au sulfocyanure, si le réactif n'a pas été employé en excès : ces caractères sont précisément ceux de l'acétate de peroxyde de fer.

*Recherche de l'acide acrylique.* — Cet acide ne possède pas de réactions chimiques aussi nettes que les précédents, permettant de le caractériser dans un mélange où il ne figure qu'en très petite quantité.

En opérant sur le premier fractionnement nous avons cependant pu reconnaître cet acide, à la fois, par la coloration jaune que prennent ses dissolutions quand on les sature par une base ; par la formation de son sel d'argent en aiguilles blanches d'un éclat soyeux, velouté, lentement altérables en brunissant à la lumière ; et par la production de ses éthers méthylique et éthylique à odeur pénétrante, irritante, provoquant le larmolement.

Nous avons essayé aussi de caractériser l'acide acrylique à l'aide de la méthode élégante instituée par Duclaux pour la reconnaissance et le dosage des acides volatils contenus dans un mélange de ces acides. Mais, cette méthode excel-



lente dans les cas simples, ne donne plus de résultats satisfaisants lorsque le nombre des acides excède deux : or, dans le cas actuel, même après destruction de l'acide formique par l'oxyde de mercure ou l'oxyde d'argent, le mélange renferme toujours, outre les acides acétique et acrylique, des traces d'au moins un acide insoluble, comme l'acide caprylique. Ces traces d'acide supérieur accompagnant l'acide acrylique dans son entraînement par volatilisation, viennent fausser sa courbe de distillation, et dans une proportion d'autant plus appréciable qu'il figure lui-même en minime quantité dans le mélange ; aussi, n'avons-nous obtenu aucun résultat certain par cette méthode.

*Analyse quantitative des acides volatils.*

Avec un mélange si complexe où l'un des représentants principaux entre pour une très faible part, et dans lequel, en outre, un acide supérieur, au moins, figure à dose infinitésimale, il est bien difficile, pour ne pas dire impossible, d'obtenir des résultats numériques exacts.

Voici la méthode que nous avons suivie pour faire l'estimation, approchée, au moins pour l'un d'entre eux, de chacun des constituants essentiels de ce mélange. Tout d'abord nous n'avons pas tenu compte des traces d'acidité insoluble ; de plus, l'acide carbonique ayant été dosé séparément et en bloc à l'état de gaz dégagé pendant l'acte de la fermentation et de gaz extrait du liquide fermenté, nous n'avions plus à nous occuper que des trois acides suivants : *formique, acétique, acrylique*.

Après avoir déterminé l'acidité volatile totale, nous avons dosé aussi exactement que possible les acides formique et acétique, constituants majeurs de cette acidité volatile ; quant à l'acide acrylique, et vu l'impossibilité de faire mieux, nous l'avons estimé par différence.

*Acidité volatile totale.* — La neutralisation par l'eau de chaux en présence de la teinture de tournesol comme réactif indicateur et jusqu'à virage au bleu franc, ou de la phtaléine de phénol, nous a permis d'équivaloir l'acidité volatile du liquide de fermentation à 0 gr. 544 d'acide acétique par litre.

Pour doser chacun des acides volatils dont l'importance

est capitale dans l'étude d'une fermentation, on utilise habituellement l'ingénieuse méthode de Duclaux dont l'opération essentielle consiste dans une distillation fractionnée suivie de la saturation par une liqueur alcaline titrée de chacun des fractionnements, et que nous employons plus loin. En principe, cette méthode semble permettre le dosage de plusieurs acides mélangés, mais en réalité, au-delà de deux acides, des causes de perturbation latérales à l'acte distillatoire faussent ordinairement les résultats.

C'est pourquoi, dans le mélange des trois acides précédents, nous avons d'abord dosé l'acide formique en utilisant son pouvoir réducteur, propriété qui n'appartient pas à son homologue voisin actuel, l'acide acétique, et pas même à l'acide acrylique dans les conditions opératoires du procédé que nous avons suivi et que nous allons reproduire immédiatement. Puis, après élimination de l'acide formique et de l'acide acrylique d'une autre partie du mélange, nous avons obtenu une nouvelle liqueur dans laquelle l'acide acétique a été évalué par une simple opération acidimétrique, d'une part, et d'autre part, suivant la méthode de Duclaux pour le dosage des acides volatils.

#### Dosage de l'acide formique.

Nous avons effectué cette analyse au moyen de l'acide iodique, en appliquant la technique opératoire indiquée par M. Béhal (1).

L'acide iodique réagit à chaud en solution aqueuse concentrée sur l'acide formique pour donner naissance à de l'iode, facile à séparer par distillation et à titrer au moyen de l'hyposulfite de soude. L'équation de la réaction qui est la suivante :



montre que 127 gr. d'iode sont mis en liberté par 115 gr. d'acide formique.

L'appareil employé se compose d'un ballon de 100<sup>cc</sup> muni d'un long col rodé fermé par un tube de verre formant bouchon, auquel vient s'adapter un réfrigérant pouvant fonctionner alternativement comme ascendant ou comme descendant.

Dans le ballon nous avons introduit 20<sup>cc</sup> du mélange des acides

(1) BÉHAL. — Bull. Soc. Chim, t. 23, p. 747 ; 1900.

volatils, volume correspondant à un litre du liquide de fermentation, puis 20<sup>cc</sup> d'une solution d'acide iodique cristallisé, au demi. L'appareil étant monté avec réfrigérant ascendant, nous avons porté la solution à l'ébullition qui a été maintenue pendant une heure : au bout de ce temps, le liquide coloré en jaune avec léger dépôt brun a été distillé au réfrigérant descendant après dilution pour faciliter l'entraînement de la totalité de l'iode qui a été recueilli dans une solution d'iodure de potassium.

Le titrage de cette liqueur avec l'hyposulfite de soude normal décime en exige 15<sup>cc</sup>7, accusant la présence de 0 gr. 199 d'iode libre, correspondant à une quantité d'acide formique

$$0\text{gr.}199 \times \frac{115}{172} = 0\text{gr.}180$$

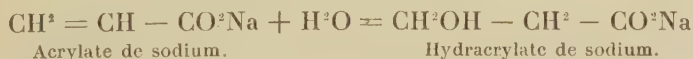
Le liquide de culture renfermait donc 0 gr. 18 d'acide formique par litre.

Dans ces conditions opératoires, les acides acétique, acrylique et même caprylique ne sont pas attaqués par l'acide iodique : nous avons vérifié que chacun d'eux traité séparément, comme l'acide formique, ne donne pas lieu à la mise en liberté d'iode.

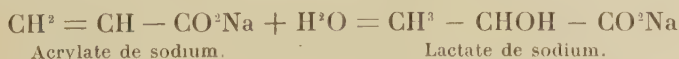
#### Dosage de l'acide acétique.

##### OPÉRATION PRÉLIMINAIRE. — ÉLIMINATION DE L'ACIDE FORMIQUE ET DE L'ACIDE ACRYLIQUE

Pour réaliser cette séparation, nous avons utilisé : d'une part, l'action oxydante de l'oxyde d'argent s'exerçant seulement vis-à-vis de l'acide formique dans le mélange des acides volatils actuels et conduisant à sa destruction totale par une combustion aussi complète que si elle avait lieu sur la grille à analyse ; d'autre part, la transformation à 100°, même en liqueur diluée, par une dissolution de soude en excès, de l'acide acrylique volatil, en un mélange d'acides hydracrylique et lactique ordinaire, fixes, conformément aux réactions d'hydratation suivantes :



réaction d'où l'acide hydracrylique tire son nom :



A 20<sup>cc</sup> du mélange des acides volatils, volume correspondant à un

litre du liquide de fermentation, on ajoute un léger excès d'oxyde d'argent récemment précipité et lavé : on laisse en digestion au bain-marie bouillant pendant une demi-heure ; au bout de ce temps, l'acide formique a réduit l'oxyde d'argent en donnant un dépôt grisâtre d'argent métallique, et s'est totalement transformé en acide carbonique et en eau, tandis que les acides acétique et acrylique demeurent dissous à l'état de sels d'argent. La liqueur est ensuite additionnée de 5<sup>cc</sup> de lessive de soude au tiers et maintenue à nouveau à 100° pendant une heure ; tout l'acrylate de sodium est alors transformé en un mélange d'hydracrylate et de lactate de sodium : on filtre pour séparer le dépôt d'argent et d'oxyde d'argent : on lave complètement le précipité jusqu'à ce que les eaux de lavage ne possèdent plus la réaction alcaline.

La nouvelle liqueur contient alors, à l'état de sels de sodium, un acide volatil, l'acide acétique, et deux acides fixes, hydracrylique et lactique ; après réduction à 20<sup>cc</sup> par évaporation au bain-marie, on l'additionne d'un léger excès d'acide tartrique et on en extrait à nouveau le constituant volatil par distillation à l'aide de la vapeur d'eau, sans dépasser la température de 100°, afin d'éviter la décomposition inverse de l'acide hydracrylique en eau et acide acrylique et en prenant les mêmes précautions distillatoires que précédemment : nous avons recueilli ainsi 200<sup>cc</sup> de liquide.

a) *Dosage de l'acide acétique par acidimétrie.* — L'opération a été effectuée sur ce volume de distillatum à l'aide de l'eau de chaux titrée et en présence de phtaléine du phénol : nous avons ainsi trouvé la quantité de 0 gr. 265 d'acide acétique par litre du liquide de fermentation.

b) *Dosage de l'acide acétique par la méthode de Duclaux.* — Il peut paraître superflu d'évaluer à nouveau l'acide acétique à l'aide de cette méthode, laquelle sert à la fois pour l'analyse qualitative et quantitative des acides volatils. Cependant, nous avons tenu à l'employer ici, à titre de comparaison et surtout de contrôle : elle nous a permis, en effet, de nous rendre compte qu'après l'élimination des acides formique et acrylique, l'acidité totale résiduelle était simplement représentée par de l'acide acétique, avec des traces d'acidité supérieure en quantité infinitésimale non dosable.

Nous avons appliqué cette méthode classique (1) à un prélèvement de 20<sup>cc</sup> du mélange des acides volatils, volume correspondant à un litre du liquide de fermentation : après élimination des acides formique et acrylique, nous avons

(1) E. DUCLAUX. — *Annales de Chimie et de Physique*, 6<sup>e</sup> série, t. 8, p. 542 ; 1886. — *Traité de Microbiologie*, t. 3, p. 385.



condensé la totalité de l'acide acétique dans un volume de distillatum égal à 110<sup>cc</sup>. Les fractionnements successifs de distillation de ce liquide dans l'appareil de Duclaux, spécial à cette analyse, ont donné les valeurs suivantes à la saturation par l'eau de chaux :

| Fractionnements<br>de 10 cc. | Eau de chaux      | Fractionnements<br>totalisés | Eau de chaux      |
|------------------------------|-------------------|------------------------------|-------------------|
| 1 <sup>er</sup>              | 6 <sup>cc</sup> 1 | 10 premiers cmc.             | 6 <sup>cc</sup> 1 |
| 2 <sup>e</sup>               | 6. 7              | 20 —                         | 12. 8             |
| 3 <sup>e</sup>               | 6. 9              | 30 —                         | 19. 7             |
| 4 <sup>e</sup>               | 7. 0              | 40 —                         | 26. 7             |
| 5 <sup>e</sup>               | 7. 4              | 50 —                         | 34. 1             |
| 6 <sup>e</sup>               | 7. 9              | 60 —                         | 42. 0             |
| 7 <sup>e</sup>               | 8. 5              | 70 —                         | 50. 5             |
| 8 <sup>e</sup>               | 9. 3              | 80 —                         | 59. 8             |
| 9 <sup>e</sup>               | 10. 4             | 90 —                         | 70. 2             |
| 10 <sup>e</sup>              | 12. 6             | 100 —                        | 82. 8             |

A l'examen de ces nombres, on remarque que la progression de leur croissance n'est pas régulière et qu'elle atteint un minimum vers le troisième terme. Cette irrégularité tient au passage dans le début de la distillation des traces d'acide supérieur dont nous avons signalé l'existence dans le liquide de fermentation et que les traitements précédents n'ont pas éliminé. A partir du troisième fractionnement, la marche ascendante des nombres est régulière et correspond bien à celle que fournit l'acide acétique dans les mêmes conditions opératoires.

L'eau de chaux employée étant telle que un centimètre cube sature 0 gr. 0027 d'acide acétique, cette équivalence donne pour la quantité de cet acide contenue dans les cent premiers centimètres cubes passés à la distillation, l'égalité :

$$82.8 \times 0^{\text{gr}}.0027 = 0^{\text{gr}}.2235$$

Soit pour la totalité de l'acide acétique du liquide soumis à la distillation :

$$\frac{0^{\text{gr}}.2235 \times 100}{80} = 0^{\text{gr}}.2794$$

le coefficient  $\frac{100}{80}$  ou  $\frac{5}{4}$  représentant, pour l'acide acétique, le rapport du volume d'eau de chaux nécessaire pour saturer la totalité de l'acide au volume nécessaire pour saturer les cent premiers centimètres cubes.

Ce résultat concorde suffisamment avec celui obtenu par la méthode précédente : leur ensemble donnant comme

moyenne 0 gr. 272 d'acide acétique par litre du liquide de fermentation.

*Estimation de l'acide acrylique.* — Ainsi que nous l'avons déjà expliqué plus haut, cet acide a été évalué par différence entre l'acidité volatile totale et l'acidité due à l'ensemble des acides formique et acétique.

|                                             |                                                             |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Acidité volatile totale en acide acétique,  | 0gr.544                                                     |
| — formique —                                | 0gr.18 $\times \frac{60}{46} = 0gr.18 \times 1.304 = 0.234$ |
| — acétique —                                | 0.272                                                       |
| Total des acidités formique et acétique,    | 0.506                                                       |
| Acidité <i>acrylique</i> en acide acétique, | 0gr.544 — 0gr.506 = 0.038                                   |
| — en acide acrylique,                       | 0gr.038 $\times \frac{72}{60} = 0gr.038 \times 1.2 = 0.045$ |

soit 0 gr. 045 d'acide acrylique par litre de culture.

Nous devons rappeler ici que cette évaluation de l'acide acrylique, incertaine d'abord par son caractère arithmétique, se trouve en outre très légèrement majorée par la présence de traces infinitésimales d'acide supérieur.

#### ACIDITÉ FIXE

Le liquide résiduel, après la séparation des produits volatils, possède une réaction nettement acide au tournesol, même lorsque le milieu de culture a été préparé à l'aide du phosphate bipotassique, alcalin à ce réactif; ce liquide contient donc au moins un acide fixe : en réalité, il renferme les acides *lactique* et *succinique*.

#### *Analyse qualitative des acides fixes.*

Pour rechercher et doser chacun de ces acides, nous avons adopté la méthode suivante, habituellement suivie en pareil cas. Le liquide est évaporé et le résidu privé d'eau est épuisé complètement par l'éther : l'extrait éthéré est repris par l'alcool et les acides lactique et succinique sont séparés par saturation à l'aide de l'eau de baryte en se fondant sur ce fait que le succinate de baryte n'est pas soluble dans l'alcool, tandis que le lactate de baryte reste dissous dans ce liquide.

Dans l'application de cette méthode, la première opération que doit subir la liqueur résiduelle contenant les acides fixes est une évaporation. Commencée à la température de 100°, cette évaporation a été terminée dans le vide en pré-

sence de l'acide sulfurique pour éviter autant que possible la perte de traces d'acide lactique, qui deviennent appréciables à la fin de la concentration, lorsque l'opération est continuée à la chaleur du bain-marie, ainsi que nous avons pu nous en rendre compte directement en procédant au titrage d'une solution de cet acide, avant et après l'évaporation d'un volume déterminé à la température de l'eau bouillante.

En fait, voici les diverses expériences que nous avons exécutées à ce sujet et que nous tenons à rapporter dans cette partie de notre travail.

Pour obtenir une solution d'acide lactique pur, nous avons employé le lactate de zinc cristallisé chimiquement pur : 4 grammes de ce sel ont été dissous dans 800<sup>cc</sup> d'eau, et le métal a été précipité par l'hydrogène sulfuré ; la liqueur filtrée, additionnée de l'eau de lavage du précipité a été portée à l'ébullition pendant quelques minutes, jusqu'à ce que l'odeur sulfhydrique ait disparu, puis abandonnée au refroidissement et complétée à un litre.

Un volume de 50<sup>cc</sup> de cette liqueur exige pour sa neutralisation, en présence de phtaléine du phénol, 31<sup>cc</sup> d'eau de chaux, de titre tel qu'il en faut 23<sup>cc</sup> pour saturer 10<sup>cc</sup> d'acide sulfurique déci-normal, ce qui donne pour titre de la liqueur en acide lactique, 2 gr. 41 par litre.

La composition moléculaire du lactate de zinc cristallisé  $(\text{C}^{\text{H}}\text{O}^3)^2 \text{Zn} + 3\text{H}^2\text{O}$ , et la prise d'essai de 4 grammes que nous avons employée, attribuent à la même solution le titre de 2 gr. 40 en acide lactique par litre : la concordance de ces résultats sert de contrôle à la pureté du lactate de zinc et, par suite, à celle de la solution d'acide lactique qui doit servir à ces expériences.

*Première expérience.* — Un volume de 50<sup>cc</sup> de la liqueur est évaporé au bain-marie jusqu'à réduction au dixième, c'est-à-dire à 5<sup>cc</sup> ; ce résidu complété au volume initial avec de l'eau distillée et neutralisé par l'eau de chaux précédemment employée, en présence de phtaléine, exige 30<sup>cc</sup>5 de ce liquide : dans ces conditions, il n'y a donc pas eu perte sensible d'acide lactique.

*Deuxième expérience.* — Un volume de 50<sup>cc</sup> de la liqueur est évaporé au bain-marie dans une capsule de porcelaine au-dessus de laquelle est suspendu un papier bleu de tournesol ; ce papier conserve sa couleur jusque vers la fin de l'opération ; mais, lorsqu'il ne reste plus que un centimètre cube de liquide environ, il commence à rou-

gir : le titrage effectué à ce moment et après rétablissement du volume initial montre que la saturation de l'acide n'exige plus que 27<sup>cc</sup> d'eau de chaux.

*Troisième expérience.* — Un volume de 50<sup>cc</sup> de la liqueur est évaporé au bain-marie jusqu'à obtention d'un résidu sirupeux : à ce moment et après rétablissement du volume initial, la saturation de l'acide n'exige plus que 18<sup>cc</sup> d'eau de chaux.

*Quatrième expérience.* — Un volume de 50<sup>cc</sup> de la liqueur est évaporé au bain-marie jusqu'à obtention d'un résidu sirupeux ; puis l'évaporation est continuée pendant une heure : après rétablissement au volume initial, il suffit de moins de 2<sup>cc</sup> d'eau de chaux pour saturer l'acidité restante ; presque tout l'acide lactique a disparu.

*Cinquième expérience.* — Un volume de 50<sup>cc</sup> de la liqueur est évaporé au bain-marie jusqu'à réduction à 5<sup>cc</sup> ; la capsule est ensuite placée dans le vide sec, jusqu'à obtention d'un résidu sirupeux, en évitant de prolonger l'action du vide : après reprise par 50<sup>cc</sup> d'eau distillée, la neutralisation exige 30<sup>cc</sup> 2 d'eau de chaux.

*Sixième expérience.* — En répétant l'essai précédent, mais en prolongeant l'action du vide pendant douze heures après l'obtention du résidu sirupeux, la neutralisation exige encore 29<sup>cc</sup> 5 d'eau de chaux.

\* Ces essais montrent donc qu'il ne faut pas évaporer *complètement* au bain-marie une solution aqueuse d'acide lactique destinée à un dosage : pour une solution d'un titre voisin de celle qui a servi aux expériences précédentes, il convient de borner cette opération à une simple réduction au dixième.

En terminant l'évaporation dans le vide, on peut considérer le titre acide comme restant invariable, à condition de ne pas prolonger l'opération au delà du départ des dernières traces d'eau ; car, sous cette pression très réduite et même à la température ordinaire, l'acide lactique possède déjà une faible tension de vapeur dont l'effet peut à la longue modifier très sensiblement son titre.

Pendant que nous faisons ces vérifications nous avons tenu aussi à nous assurer de l'importance de la perte en acide lactique, par entraînement avec la vapeur d'eau, au moment de l'extraction des acides volatils. A ce sujet, nous avons fait l'expérience supplémentaire suivante :

Une nouvelle prise de 50<sup>cc</sup> de la liqueur est distillée dans un courant de vapeur d'eau, à l'aide d'un appareil spécial servant à l'extraction des acides volatils ; l'arrivée de la vapeur est réglée de telle sorte que le volume initial de 50<sup>cc</sup> demeure à peu près invariable et surtout qu'il ne diminue pas : après écoulement d'un volume de liquide



condensé égal à 250<sup>cc</sup>, on constate que ce distillatum a une réaction légèrement acide, acidité qui est saturée par 1<sup>cc</sup> 8 d'eau de chaux : la neutralisation du liquide du ballon n'exige plus que 28<sup>cc</sup> 9 de cette liqueur alcaline. Il y a donc eu entraînement d'acide lactique par la vapeur d'eau.

Et cependant, la condensation d'un volume de liquide quintuple de celui mis en œuvre est à peine suffisante pour l'extraction de la totalité des acides volatils, au moins en ce qui concerne l'acide formique. D'après ce qui précède, on comprend qu'il conviendra de limiter convenablement l'opération afin de réduire au minimum cette nouvelle cause de diminution du titre lactique, la première entrant réellement en jeu, et tenant, elle aussi, à la volatilité relative non négligeable de cet acide.

Il est nécessaire aussi d'observer que la perte en acide lactique par volatilisation ou entraînement avec la vapeur d'eau est, toutes choses égales d'ailleurs, proportionnelle à la concentration de la solution en cet acide. Dans la fermentation actuelle, la liqueur qui a été soumise à la séparation des acides volatils par la vapeur d'eau et dont le volume maintenu ou complété à deux litres va nous servir pour la recherche et le dosage des acides fixes, possède une richesse en acide lactique moitié moindre que celle de la solution employée dans les expériences précédentes. Pour les autres fermentations, la concentration lactique sera encore inférieure ou très voisine de celle de cette solution.

Nous avons appliqué les mêmes recherches à l'acide succinique et nous avons constaté que sa fixité était beaucoup plus grande que celle de l'acide lactique.

Dans ce but, nous avons préparé une solution d'acide succinique à 2 gr. par litre : un volume de 50<sup>cc</sup> de cette liqueur exige pour la neutralisation 39<sup>cc</sup> d'eau de chaux.

Après évaporation au bain-marie d'une même prise d'essai, jusqu'à obtention d'un résidu d'environ un demi centimètre cube, c'est-à-dire presque à sec, un papier de tournesol bleu suspendu au-dessus de la capsule n'a pas rougi : le résidu complété au volume initial de 50<sup>cc</sup> avec de l'eau distillée nécessite pour la saturation 38<sup>cc</sup> 6 d'eau de chaux.

En évaporant à sec un nouveau volume de 50<sup>cc</sup> et laissant la capsule encore une heure à la température de 100°, le résidu après reprise par l'eau demande pour la neutralisation 38<sup>cc</sup> de liqueur alcaline.

Ces explications sur la volatilité relative de l'acide lactique

et la fixité comparativement supérieure de l'acide succinique étant données, revenons à l'étude des acides fixes formés dans notre fermentation. Ils sont contenus dans le liquide résiduel de l'extraction des acides volatils. Ce liquide, provenant de dix litres de culture, a été filtré et son volume complété à deux litres : mille centimètres cubes, correspondant à cinq litres de liquide de fermentation ont été évaporés, d'abord au bain-marie jusqu'à réduction au dixième, puis l'évaporation a été terminée dans le vide sec jusqu'à résidu sirupeux. Cet extrait, trituré avec du sable fin, a été épuisé à plusieurs reprises et *complètement* par l'éther à 65° bouillant, suivant la méthode habituelle, dans un appareil à extraction muni d'un réfrigérant à reflux : la séparation de ce dissolvant par distillation a laissé une très petite quantité d'un liquide visqueux faiblement coloré en jaune orangé. Ce nouvel extrait, contenant les acides fixes mélangés à diverses impuretés, a été repris à plusieurs fois avec de l'alcool à 95° chaud, en filtrant chacun des liquides d'épuisement sur le même filtre, et jusqu'à obtention d'un volume de filtratum égal à 100 centimètres cubes. Cette liqueur homogène a été partagée en deux fractionnements : l'un de 80<sup>cc</sup>, devant servir à la recherche qualitative des acides fixes ; l'autre, de 20<sup>cc</sup>, pour procéder à leur dosage.

#### Recherche des acides lactique et succinique.

Pour cette analyse qualitative, comme pour le dosage de ces acides, nous avons utilisé une méthode fondée sur le principe suivant :

*Lorsqu'on sature à chaud une solution alcoolique d'acides lactique et succinique par l'eau de baryte, le titre de la liqueur alcoolique demeurant au voisinage de 75°-80°, tout l'acide succinique précipite à l'état de succinate de baryte anhydre, le lactate de baryte restant en dissolution.*

Le fractionnement alcoolique précédent, du volume de 80<sup>cc</sup>, introduit dans une fiole conique en verre de Bohême, a été additionné de deux gouttes de solution de phthaléine du phénol et porté à l'ébullition au bain-marie ; nous y avons ajouté goutte à goutte une solution saturée d'hydrate de baryte jusqu'à neutralisation, et le mélange a été maintenu encore dix minutes environ au voisinage de l'ébullition : il s'est formé un précipité se rassemblant facilement et qui a été séparé par filtration et lavage avec l'alcool à 90° bouillant, jusqu'à ce que le filtratum ne précipite plus par l'acide sulfurique.

Etude du précipité. — Recherche de l'acide succinique.

La formation du précipité barytique dans l'expérience de saturation précédente permet déjà de prévoir, en l'absence des acides oxalique, tartrique, malique et citrique, l'existence de l'acide succinique dans la solution alcoolique. Nous avons contrôlé cette présence par l'essai suivant :

Le filtre contenant le précipité a été percé et ce dernier entraîné dans un tube à essai par le jet d'une pissette à eau : l'addition ménagée de quelques gouttes d'acide sulfurique a précipité la baryte et remis en liberté l'acide organique primitivement combiné avec cette base. Après repos, la liqueur surnageant le précipité barytique a été décantée ; elle possède une très faible coloration brunâtre. Une moitié a été neutralisée par de l'eau ammoniacale, puis évaporée à sec pour chasser l'excès d'ammoniaque ; le résidu repris par un peu d'eau, puis traité par quelques gouttes de perchlorure de fer, nous a donné un précipité gélatineux abondant, rouge brunâtre pâle, couleur d'ocre, soluble dans l'acide acétique, l'acide succinique et les acides minéraux : l'autre moitié de la liqueur a été neutralisée exactement par la soude, puis additionnée d'une solution de perchlorure de fer ammoniacal obtenue en ajoutant avec précaution dans le réactif chlorure ferrique, de l'ammoniaque très étendue, jusqu'à ce que le liquide soit rouge brun foncé, mais encore clair ; nous avons obtenu ainsi un précipité volumineux, coloré et soluble, comme le précédent.

Dans les conditions expérimentales de ces deux opérations qui ne sont que des variantes d'une même réaction chimique, l'acide succinique fournit un précipité de *succinate basique de peroxyde de fer*,  $2 (C^4 H^4 O^4)^3 Fe^2 + Fe^2 O^3$ , possédant les caractères des précédents.

L'emploi, dans la seconde expérience, du réactif ammoniacal qui équivaut en réalité à une solution d'hydrate ferrique gélatineux dans le perchlorure de fer neutre, où cet hydrate est facilement soluble, offre un double avantage : d'une part, en neutralisant l'acide succinique mis partiellement en liberté par la formation du sel basique, il évite la redissolution par cet acide d'une quantité correspondante du précipité ; d'autre part, la fraction de cet acide ainsi libérée dans la première expérience se combine ici avec l'oxyde de fer supplémentaire du réactif en accroissant d'autant le volume du précipité. En un mot, le réactif ferrique ainsi modifié augmente la sensibilité de la réaction.





former à sa surface un dépôt noir, miroitant, dû à l'argent réduit par l'aldéhyde.

Nous avons également obtenu la même réaction en chauffant la solution aqueuse du résidu avec un peu de bioxyde de plomb.

L'ensemble de ces trois caractères suffit pour affirmer la présence de l'acide lactique.

La minime quantité de cet acide ainsi extrait ne nous a pas permis de caractériser ici cette substance au point de vue de son action sur la lumière polarisée ; mais nous avons pu faire cette détermination sur l'acide provenant de la fermentation de la glycérine en présence de carbonate de chaux, et formé en quantité beaucoup plus notable. Cet acide lactique se montre alors, d'après le titre acide de la liqueur employée et la déviation observée, comme constitué par un mélange de ses représentants, inactif et gauche.

#### Recherche d'autres acides fixes.

Dans les nombreuses fermentations de la glycérine effectuées à l'aide du bacille que nous étudions, l'analyse qualitative en vue de la reconnaissance d'autres acides, en particulier les acides oxalique, tartrique, malique et citrique, a toujours été négative.

De plus, et ainsi que nous allons le voir dans l'analyse quantitative qui suit, la transformation sulfurique des sels barytiques contenus dans le précipité et la liqueur dont il vient d'être question, suivie de la pesée de chacun des deux précipités de sulfate de baryte ainsi formés, donne des résultats numériques en accord avec l'existence dans la liqueur alcoolique d'extraction des acides fixes, des seuls représentants lactique et succinique.

#### *Analyse quantitative des acides fixes.*

Avec le second fractionnement alcoolique, du volume de 20<sup>cc</sup>, correspondant à un litre du liquide de fermentation, nous avons procédé exactement comme dans l'essai qualitatif précédent, à la séparation des acides lactique et succinique à l'état de sels de baryte.

#### Dosage de l'acide succinique.

Le succinate de baryte est détaché en totalité du filtre par entraînement à l'aide d'un jet de pissette et recueilli

dans une capsule de platine tarée ; après évaporation au bain-marie, le précipité formé par ce sel qui cristallise à l'état anhydre, a été desséché à l'étuve à 130° pendant dix minutes et pesé.

Poids du succinate de baryte : 0 gr. 2688.

*Transformation du succinate de baryte en sulfate de baryte.* — Cette opération constitue un contrôle utile et permet mieux encore qu'une réaction qualitative, de reconnaître, par sa teneur en baryte, comme espèce chimique définie sous forme de succinate de baryum, le précipité déjà évalué comme tel.

Dans la capsule qui le contient, on humecte ce précipité uniformément avec quelques gouttes d'acide sulfurique, puis on calcine avec les précautions habituelles ; après refroidissement dans le dessiccateur et pesée, le résultat a été le suivant :

|                              | Trouvé     | Calculé    |
|------------------------------|------------|------------|
| Poids du sulfate de baryte : | 0 gr. 2499 | 0 gr. 2475 |

Sachant que 1 gramme de succinate de baryte correspond à 0 gr. 9209 de sulfate de baryte, le poids trouvé de ce dernier sel est légèrement supérieur à celui calculé à partir du premier : cela tient à la formation d'un peu de carbonate de baryte pendant et surtout après la saturation des acides à l'aide de l'eau de baryte dont on introduit toujours quelques gouttes en excès, malgré la présence du réactif indicateur.

#### Calcul de l'acide succinique :

Au moyen du succinate de baryte :  $0 \text{ gr. } 2688 \times 0.4664 = 0 \text{ gr. } 1253$

$$\begin{array}{l} \text{C}^4\text{H}^6\text{O}^4 = 118 \\ \text{C}^4\text{H}^4\text{O}^4\text{Ba} = 253 \end{array} \quad \frac{118}{253} = 0.4664$$

Au moyen du sulfate de baryte :  $0 \text{ gr. } 2499 \times 0.5064 = 0 \text{ gr. } 1265$

$$\begin{array}{l} \text{C}^4\text{H}^6\text{O}^4 = 118 \\ \text{SO}^4\text{Ba} = 233 \end{array} \quad \frac{118}{233} = 0.5064$$

Soit, en moyenne, une quantité de 0 gr. 1259 d'acide succinique par litre du liquide de fermentation.

Acidité acétique équivalente :  $0 \text{ gr. } 1259 \times 1.016 = 0 \text{ gr. } 1279$

$$\begin{array}{l} \text{C}^2\text{H}^4\text{O}^2 = 60 \\ 1/2 \text{ C}^4\text{H}^6\text{O}^4 = 59 \end{array} \quad \frac{60}{59} = 1.016$$

### Dosage de l'acide lactique.

Le liquide alcoolique filtré, contenant le lactate de baryte, est évaporé au bain-marie dans une capsule de platine tarée, puis desséché à l'étuve à 130° pendant trois heures et pesé.

Poids du lactate de baryte anhydre : 0gr.4200

#### *Transformation du lactate de baryte en sulfate de baryte.*

— Cette transformation a été opérée comme précédemment pour l'acide succinique : elle constitue également un contrôle précieux dans l'identification du résidu salin sirupeux incristallisable, comme lactate de baryum.

|                              |          |          |
|------------------------------|----------|----------|
|                              | Trouvé   | Calculé  |
| Poids du sulfate de baryte : | 0gr.3380 | 0gr.3240 |

Sachant que 1 gramme de lactate de baryum correspond à 0gr.7396 de sulfate de baryte, le poids trouvé pour ce dernier sel est légèrement supérieur à celui calculé à partir du premier : cela tient à ce que le lactate n'est pas pur et contient des traces de carbonate de baryte formé après la saturation des acides et la filtration, par les quelques gouttes d'eau de baryte introduites en excès dans la liqueur.

#### Calcul de l'acide lactique :

Au moyen du lactate de baryte : 0gr.42 × 0.5714 = 0gr.2500

$$\begin{array}{rcl} \text{C}^3\text{H}^6\text{O}^3 & = & 90 \\ (\text{C}^3\text{H}^5\text{O}^3)^2\text{Ba} & = & 315 \end{array} \quad \frac{180}{315} = 0.5714$$

Au moyen du sulfate de baryte : 0gr.338 × 0.7725 = 0gr.2611

$$\begin{array}{rcl} \text{C}^3\text{H}^5\text{O}^3 & = & 90 \\ \text{SO}^4\text{Ba} & = & 233 \end{array} \quad \frac{180}{233} = 0.7725$$

Soit, en moyenne, une quantité de 0gr.255 d'acide lactique par litre du liquide de fermentation.

Acidité acétique équivalente : 0gr.255 × 0.644 = 0gr.1642

$$\begin{array}{rcl} \text{C}^2\text{H}^4\text{O}^2 & = & 60 \\ \text{C}^3\text{H}^6\text{O}^3 & = & 90 \end{array} \quad \frac{60}{90} = 0.644$$

|                                  |          |         |
|----------------------------------|----------|---------|
|                                  | Trouvé   | Calculé |
| Acidité fixe en acide acétique : | 0gr.2921 | 0gr.306 |

$$\begin{array}{rcl} 0\text{gr.}1279 & + & 0\text{gr.}1642 = 0\text{gr.}2921 \\ 0\text{gr.}85 & - & 0\text{gr.}544 = 0\text{gr.}306 \end{array}$$

les nombres 0gr.85 et 0gr.544 représentant respectivement les

valeurs de l'acidité totale et de l'acidité volatile, antérieurement déterminées.

### Recherche des alcools.

L'examen du fractionnement de distillation mis à part au moment de la séparation des acides volatils, en vue de la recherche des alcools, montre qu'il contient de l'alcool éthylique. Ce fractionnement a été divisé en deux portions d'un égal volume, l'une devant servir à l'analyse qualitative, l'autre au dosage.

#### *Analyse qualitative et quantitative de l'alcool éthylique.*

Une partie de ce liquide, correspondant à huit litres de culture, soit les huit dixièmes, a été rectifiée à l'aide d'un tube Le Bel-Henninger à six boules, jusqu'à obtention d'un volume de distillatum égal au vingtième du volume primitif : dans ce nouveau fractionnement ainsi enrichi en alcool, ce produit a été caractérisé par les réactions suivantes.

1° *Par transformation en iodoforme*, d'après le procédé de Lieben-Hager :

A 20<sup>cc</sup> du liquide distillé, chauffé au bain-marie à 50°, on a ajouté 2<sup>cc</sup> de lessive de soude, puis goutte à goutte une solution aqueuse d'iode à 1 p. 100 environ, dans l'iodure de potassium, jusqu'à coloration jaune brunâtre qu'on a fait disparaître par une goutte de soude : le liquide a pris une odeur très nette d'iodoforme ; par refroidissement, il s'est formé un louche blanc jaunâtre. Après repos, l'examen microscopique du léger dépôt rassemblé a montré des cristaux de forme hexagonale ou dérivée de l'hexagone : cette dernière réaction microchimique a été rendue plus sensible en épuisant le liquide aqueux alcalin par de l'éther, dissolvant qui a été ensuite additionné d'un peu d'alcool et mis à évaporer sur une lame porte-objet.

Comme beaucoup d'autres substances que l'alcool éthylique et notamment son aldéhyde et l'acétone ordinaire donnent dans les mêmes conditions de l'iodoforme, nous avons varié l'essai précédent en remplaçant la soude par l'ammoniaque.

A 20<sup>cc</sup> du liquide nous avons ajouté 1<sup>cc</sup> d'ammoniaque et quelques gouttes de solution iodée ; il s'est formé uniquement un léger précipité gris noir permanent d'iodure d'azote. Dans les mêmes circonstances, avec l'aldéhyde acétique et l'acétone, à ce précipité succède rapidement un trouble blanc jaunâtre d'iodoforme.



Il est à remarquer que dans cette recherche on n'a guère à craindre la présence d'aldéhydes, pas même d'acroléine, car le liquide utilisé a été obtenu par redistillation d'une liqueur rendue alcaline par saturation à l'aide d'un léger excès d'eau de baryte, et l'on sait que les alcalis, surtout à chaud, sont très nuisibles aux aldéhydes, dont ils modifient profondément la molécule, notamment le groupement fonctionnel aldéhydique lui-même : en fait, ce liquide ne donne aucune coloration avec le réactif de Schiff, au bisulfite de rosaniline.

2° *Par transformation en aldéhyde.* — A 50<sup>cc</sup> du liquide on a ajouté 0<sup>gr</sup>.2 de bichromate de potasse en poudre et 1<sup>cc</sup> d'acide sulfurique au cinquième en poids ; après dissolution du bichromate, le mélange a été soumis à la distillation très lente dans le petit appareil déjà utilisé et décrit au début de cette étude, jusqu'à obtention d'un premier fractionnement de 10<sup>cc</sup> : au cours de cette opération, la présence de l'alcool est déjà soupçonnée par la coloration verte du liquide du ballon due à la production de sulfate chromique, et on reconnaît ensuite très nettement, à l'orifice du tube de condensation, l'odeur spéciale de l'aldéhyde acétique, dont la présence dans le fractionnement a été mise en évidence par les deux essais suivants :

a) Une moitié du distillatum, soit 5<sup>cc</sup>, a été additionnée de son volume du réactif classique des aldéhydes au bisulfite de rosaniline, lequel a développé progressivement une coloration rose violacée dans le liquide ; mais il s'agit ici d'un réactif de groupe, dont la recoloration caractérise la fonction aldéhyde en général, sans attribution nominale.

b) *Principe.* — Cet essai est fondé sur la propriété que possède le réactif *albumine-acide chlorhydrique nitreux* de donner une coloration jaune avec l'éthanal. Cette réaction colorée est très sensible ; elle se produit et est encore perceptible pour la dilution de  $\frac{1}{1000.000}$  : de plus, les aldéhydes voisins, homologues supérieurs, propylique ; butylique, isobutylique, valérianique, ne donnent rien de semblable ; quant à l'homologue inférieur, le méthanal, il fournit une belle coloration violette. Pour l'alcool éthylique, la réaction de transformation en aldéhyde rapproche à  $\frac{1}{10.000}$  la limite de sensibilité.

En répétant avec l'autre moitié du fractionnement la même opération, antérieurement indiquée dans le mode d'emploi du réactif *protéique acide* pour la recherche de l'acroléine, nous avons obtenu immédiatement une coloration jaune intense due à l'éthanal.

Ajoutons que cette méthode d'analyse qualitative peut devenir quantitative par colorimétrie, lorsque le liquide examiné renferme comme alcool uniquement l'alcool éthylique. Nous donnons plus loin les détails de cette méthode analytique avec application au cas particulier actuel.

### 3° *Par formation des éthers butyrique et benzoïque :*

Une partie du fractionnement a été additionnée d'une goutte d'acide butyrique et du quart de son volume d'acide sulfurique : après quelque temps de contact à température tiède, le mélange porté à l'ébullition a dégagé l'odeur spéciale, très nette d'ananas, que donne le butyrate d'éthyle formé en pareille circonstance.

Une autre partie du liquide additionnée de quelques gouttes de chlorure de benzoyle, puis de soude, jusqu'à disparition de l'odeur propre de ce dernier corps, a donné à chaud l'odeur aromatique, pénétrante du benzoate d'éthyle.

### 4° *Par la réaction de Agulhon (1), en l'absence d'aldéhydes :*

A 1 centimètre cube du liquide on ajoute 3 centimètres cubes d'acide azotique concentré tenant en dissolution 0,5 p. 100 de bichromate de potasse. Il se produit à froid, en quelques minutes, une coloration bleu violet, indiquant la présence d'un corps à fonction alcool.

5° *Par utilisation de la propriété que possède l'alcool d'avoir une tension superficielle inférieure à celle de l'eau, une constante capillaire différente de celle de ce liquide.*

PAR DISTILLATION. — Au cours de l'opération de rectification précédente, les premières gouttes qui se sont condensées à l'intérieur du tube contenu dans le réfrigérant, y ont fourni les stries particulières que l'on observe toujours dans l'acte de la distillation d'un liquide aqueux pauvre en alcool ; sortes de larmes qui coulent sur les parois humides du tube et semblent ne pas les mouiller, ou se présentent comme des gouttes blanchâtres d'un liquide huileux imparfaitement émulsionné, laissant derrière elles en roulant une trace plus ou moins allongée qui se résout à son tour en gouttelettes nouvelles.

Il est nécessaire de remarquer que, si ce phénomène de formation des gouttelettes est parfaitement net avec l'alcool, qui donne les stries les plus visibles et les plus durables, il n'est pas absolument spécial à ce produit, et que d'autres

(1) G. BERTRAND et P. THOMAS. — *Guide pour les manipulations de chimie biologique*, 2<sup>e</sup> édition, p. 395.

substances volatiles le donnent aussi d'une façon plus ou moins apparente. Pour ce mode de caractérisation il est donc bon d'utiliser sous une autre forme, la faible tension superficielle de l'alcool.

PAR STALAGMOMÉTRIE. — Les mélanges d'alcool et d'eau ont des tensions superficielles moindres que l'eau pure. Si on les fait couler par gouttes, sous un volume donné, à travers un orifice de dimensions invariables, on observe *que le nombre des gouttes correspondant à chacun de ces mélanges est constant, et que ce nombre est d'autant plus grand que la proportion d'alcool est plus grande.*

En sorte que cette méthode d'utilisation de la faiblesse relative de la tension superficielle de l'alcool, imaginée par Duclaux, constitue un procédé à la fois alcooscopique et alcoométrique.

Pour mettre en œuvre cette méthode (1), Duclaux s'est servi d'un compte-gouttes pipette très simple et a dressé des tables spéciales se rapportant à chacun des principaux alcools de fermentation. Par cette méthode, chaque alcool est caractérisé par la densité de sa solution aqueuse et le nombre de gouttes données par 5<sup>cc</sup> de cette solution : les déterminations des tables sont censées faites à la température de 15° ; toutefois, pour des températures différentes, il est facile de passer de la densité trouvée à t° à la densité calculée à 15°, et en ce qui concerne le nombre de gouttes, Duclaux a institué aussi des tables permettant de faire les corrections nécessaires.

En supposant le cas le plus simple où un seul alcool est présent, le nombre de gouttes correspondant à une certaine densité donne le *nom* de l'alcool : la densité mesurée, soit à l'alcoomètre, soit de préférence par la méthode du flacon, donne la proportion centésimale en volume. De sorte qu'une solution alcoolique inconnue étant donnée, on la passe au compte-gouttes, on cherche dans les tables celle où le nombre de gouttes trouvé correspond à la densité, et cette table donne par une seule lecture le *nom* de l'alcool et sa *proportion* dans le mélange.

Comme cette méthode de recherche est à la fois qualitative et quantitative, et que, pas plus que les précédentes, surtout qualitatives, elle ne peut être pratiquée directement sur le liquide primitif de fermentation, nous avons soumis à une rectification soignée la seconde partie du fractionnement mis à part au moment de l'extraction des acides volatils, représentant les deux dixièmes de son volume total et

(1) E. DUCLAUX. — *Traité de Microbiologie*, t. 3, p. 7 et t. 4, p. 27, 35

correspondant à deux litres de culture ; la première partie venant de servir à l'analyse qualitative. Tout l'alcool provenant de deux litres de liquide de fermentation a été ainsi récupéré dans un volume de distillatum égal à 125<sup>cc</sup>, lequel nous a servi pour l'étude stalagmométrique actuelle et aussi pour les différentes autres méthodes de dosage.

Cette liqueur possède la densité de 0,9982 à la température de 15°. Un volume de 5<sup>cc</sup> mesuré à la pipette compte-gouttes et à la même température fournit exactement 106 gouttes.

En consultant les tables, à l'aide de ces résultats, nous avons reconnu immédiatement la présence d'un seul alcool dans le liquide étudié, l'alcool éthylique.

Les nombres précédents sont en outre entièrement d'accord à fixer la proportion de cet alcool à 0,8 p. 100 environ, en volume, soit 1<sup>cc</sup> pour 125<sup>cc</sup> ; ce qui correspond à un *demi-millième* en volume d'alcool absolu dans le liquide de fermentation.

REMARQUE. — Le liquide de rectification n'est pas absolument limpide, mais très légèrement opalescent, laiteux ; à la longue, il s'en sépare même quelques rares petits flocons blancs : cet aspect lui est communiqué par une substance insoluble dans l'eau, entraînée à la distillation, surtout au début. Cette substance n'est pas constituée par un alcool peu soluble, comme les alcools butylique et amylique, car l'analyse chimique qualitative du liquide ne révèle pas leur présence, et l'application de la méthode physique précédente, si sensible, exclut aussi l'existence en dissolution dans le liquide, au moins en quantité appréciable, d'un autre alcool que l'alcool éthylique. Ce louche ne paraît pas davantage être attribué à un produit de transformation de l'acroléine, car il se reproduit avec les liquides de fermentation d'autres substances que la glycérine, ainsi que nous aurons l'occasion de le signaler plus loin. Il est très vraisemblablement dû à un produit volatil d'excrétion du bacille, ou peut-être à la formation aux dépens de la matière fermentescible d'une trace d'alcool supérieur entièrement insoluble.

La méthode élégante de Duclaux nous a permis à la fois de *reconnaître* l'alcool éthylique ; de le *doser* ; et encore d'affirmer, au moins dans sa limite de sensibilité, qu'il est



le seul représentant de la fonction alcool existant en dissolution dans le liquide de rectification provenant de l'extraction des acides volatils. Pour une quantité aussi faible, et surtout comme contrôle de notre précédente opération, nous avons tenu à compléter ce dosage physique par des méthodes chimiques, savoir, la méthode classique par réduction de l'acide chromique, et un autre procédé colorimétrique fondé sur l'emploi de notre réactif *albumine-acide chlorhydrique nitreux*, d'après les indications citées plus haut.

*Dosage de l'alcool éthylique par réduction de l'acide chromique* : PRINCIPE. — Si dans une solution très diluée d'alcool, de titre inférieur à 0,2 p. 100, on verse un mélange en liqueur étendue de bichromate de potasse et d'acide sulfurique, et que l'on fasse bouillir, l'alcool est oxydé et l'acide chromique réduit passe à l'état de sulfate de sesquioxyde de chrome qui est coloré en *vert bleu* : aussitôt que l'alcool est transformé, le bichromate ajouté à nouveau reste en excès et la teinte passe au *vert jaune*. On a donc un virage assez sensible, et dans ces limites, la quantité de bichromate réduit est à très peu près proportionnelle à la quantité d'alcool présente dans la solution analysée.

Le mode opératoire d'abord établi par Nicloux (1) a été perfectionné par MM. Béhal et François (2), et encore simplifié par M. G. Bertrand (3) : chacun de ces procédés met en œuvre 5<sup>cc</sup> de la solution alcoolique à analyser.

La liqueur titrée employée est une solution de bichromate de potasse pur à 16 gr. 97 par litre.

Pour le calcul, on se base sur ce que chaque centimètre cube de cette liqueur correspond à un centimètre cube d'alcool absolu : l'équation de transformation de l'alcool en acide acétique montre en effet qu'il faut 1 centimètre cube de la solution de bichromate à 16 gr. 97 par litre pour oxyder l'alcool de 5 centimètres cubes d'une solution à 1 centimètre cube d'alcool absolu pour 1000. Le chiffre lu sur la burette représente alors le nombre de millièmes d'alcool contenu dans la liqueur.

Comme le fait remarquer Duclaux (4), la formule classique qui sert de base au calcul n'est pas tout à fait conforme à la réalité, attendu qu'elle ne comporte aucun dégagement

(1) M. NICLOUX. — Comptes rendus de la Soc. de Biol., t. 3, p. 841 ; 1896.

(2) BÉHAL et FRANÇOIS. — Journal de Ph. et de Ch., t. 5, p. 419 ; 1897.

(3) G. BERTRAND et P. THOMAS. — Guide pour les manipulations de Chimie biologique, 2<sup>e</sup> édition, p. 399.

(4) E. DUCLAUX. — Traité de microbiologie, t. 4, p. 37.

d'acide carbonique, tandis qu'il s'en fait en réalité une quantité correspondant à 1 ou 2 p. 100 du carbone total, et c'est là une cause d'erreur qui rend un peu vaine la précision du dosage. Néanmoins cette méthode est d'un emploi très avantageux dans le cas présent, où l'acide chromique ne peut exercer son action que sur l'alcool éthylique, la liqueur d'épreuve étant reconnue exempte d'autres alcools, ainsi que d'aldéhydes, et les acides ayant été préalablement séparés.

Pour l'application de cette méthode, nous avons dilué une partie de la liqueur alcoolique précédente, provenant de la rectification de deux litres de liquide de fermentation jusqu'à réduction à un distillat de 125<sup>cc</sup>, avec son volume d'eau distillée.

Pour l'oxydation de l'alcool de 5<sup>cc</sup> de cette nouvelle liqueur, il a fallu 3<sup>cc</sup>6 de solution de bichromate de potasse : elle contenait donc 3<sup>cc</sup>6 d'alcool par litre : soit le double,  $2 \times 3^{\text{cc}}6$ , pour la liqueur de rectification non diluée ; soit huit fois moins, ou 0<sup>cc</sup>9, pour le volume primitif de 125<sup>cc</sup>, et par conséquent une dose deux fois moindre encore, soit 0<sup>cc</sup>45 pour l'alcool contenu dans un litre du liquide de fermentation.

*Dosage colorimétrique de l'alcool éthylique après transformation en éthanal.* — Les méthodes par comparaison colorimétrique sont toujours avantageuses pour la recherche et l'estimation de minimes quantités de substances, si on les emploie dans des conditions parfaitement définies et toujours comparables entre la solution où l'on veut évaluer un certain corps et celles préparées avec des doses graduelles de ce même corps destinées à établir l'échelle de comparaison.

Dans le cas actuel d'évaluation de l'alcool éthylique par sa transformation en aldéhyde, séparation de cette dernière par distillation, et titrage ultérieur par l'emploi d'une réaction colorée, ces conditions comparatives seront facilement satisfaites en raison de la pureté du liquide aqueux alcoolique à étudier, pureté dont nous avons déjà fait ressortir les avantages dans l'emploi de la méthode précédente.

*Réactifs.* — La mise en œuvre de ce procédé nécessite deux réactifs, *acide chlorhydrique nitreux* et *eau albumineuse*, de composition déjà décrite au début de ce travail ; mais en utilisant l'acide chlorhy-

drique  $\frac{a}{2}$ , car ces réactions colorées aldéhydiques étant sensibles à l'action des oxydants, il est nécessaire de proportionner l'agent d'oxydation à la quantité d'aldéhyde sur laquelle il doit réagir. Les deux liqueurs suivantes sont également nécessaires :

Solution de bichromate de potasse à 5 gr pour 200<sup>cc</sup>.

Solution d'acide sulfurique au dixième en poids.

MODE OPÉRATOIRE. — On prépare des solutions aqueuses d'alcool éthylique absolu aux titres volumétriques respectifs, 0.2, 0.5, 0.7, 1, 3, 5, 7, 10 pour 1000, et on soumet chacune d'elles ainsi que la solution à titrer à l'oxydation ménagée par le mélange chromique, de la façon suivante :

A 50<sup>cc</sup> de liqueur alcoolique, on ajoute 5<sup>cc</sup> de solution de bichromate et 1<sup>cc</sup> de solution sulfurique ; le mélange est introduit dans un ballon de 100<sup>cc</sup> faisant partie d'un petit appareil distillatoire précédemment décrit, à propos de la recherche de l'acroléine dans les vins amers. On distille très lentement en chauffant à l'aide d'un Bunsen brûlant en veilleuse ; on recueille le distillatum dans une petite éprouvette graduée et seulement les 5 premiers centimètres cubes.

Tous les fractionnements étant ainsi obtenus, on ajoute à chacun d'eux et en même temps, d'abord 1<sup>cc</sup> d'eau albumineuse, ce qui étend à 6<sup>cc</sup>, puis trois volumes, c'est-à-dire 18<sup>cc</sup> d'acide chlorhydrique  $\frac{a}{2}$  ; il est commode de faire ce mélange dans une éprouvette graduée de 50<sup>cc</sup> : on agite pour dissoudre l'albumine coagulée, puis on transvase les liqueurs dans des tubes à essais de dimensions identiques que l'on range dans l'ordre sur un porte-tubes et on abandonne à la température du laboratoire. Il se développe progressivement dans chaque tube une coloration jaune dont l'intensité maxima est atteinte en moins d'une heure et assez stable. En comparant la teinte de la liqueur fournie par le liquide alcoolique de titre inconnu avec celle des solutions types de l'échelle, on peut obtenir une estimation suffisamment approchée de ce titre.

En appliquant cette méthode au liquide alcoolique de rectification précédent, du volume de 125<sup>cc</sup> et provenant de deux litres de culture, nous avons obtenu une teinte comprise entre celles correspondant aux titres 7 et 10 de l'échelle, plus voisine de la première que de la seconde, soit à un titre moyen d'environ 8, c'est-à-dire seize fois moindre, ou 0.5, pour le liquide primitif de fermentation ; soit 0<sup>cc</sup>50 d'alcool par litre de ce liquide.

REMARQUE. — Lorsque d'autres alcools sont présents, il se forme par condensation de l'aldéhyde éthylique avec eux, des acétals divers dont les points d'ébullition différents ne permettent pas l'estimation de cette aldéhyde par comparaison colorimétrique à l'aide d'un seul fractionnement.

*Moyenne des résultats.* — L'ensemble des nombre obtenus avec les trois méthodes de dosage donne comme moyenne  $0^{\text{cc}}48$ , soit 0 gr. 38 d'alcool éthylique par litre de culture.

#### Recherche d'alcools à point d'ébullition élevé.

Dans ce qui précède nous avons simplement examiné le fractionnement de distillation du liquide de fermentation et borné notre recherche à celle de l'alcool éthylique et de ses homologues les plus voisins : examen qui nous a conduit à reconnaître dans ce fractionnement uniquement la présence de l'alcool ordinaire.

Il nous reste encore à indiquer les résultats de l'étude, à ce point de vue, du liquide résiduel de distillation, pouvant contenir à côté de la glycérine non modifiée, d'autres alcools difficilement volatils comme elle, et nés au cours de la transformation microbienne de cette substance.

Ainsi que nous l'avons déjà signalé, cette fermentation donne naissance à de petites quantités d'un alcool relativement fixe, son point d'ébullition étant situé à  $214^{\circ}$ , et qui est le *propylglycol normal*,  $\text{OH-CH}^1\text{-CH}^2\text{-CH}^3\text{-OH}$ , ou *glycol triméthylénique*. Lorsque nous étudierons la fermentation de la glycérine en présence de carbonate de chaux, nous ferons connaître les détails de la mise en évidence et du dosage de cet alcool diatomique, dont la formation en quantité plus importante dans la transformation alors à peu près complète de la substance fermentescible qui lui donne naissance, en permet plus facilement l'analyse.

#### Recherche, dosage et variations de l'acroléine.

Les faits qui suivent, relatifs à cette étude particulière ont été reconnus par l'examen bi-quotidien de plusieurs fermentations et représentent ou traduisent la moyenne des résultats obtenus au cours de ces observations.

L'acroléine a été révélée et dosée à l'aide du réactif *albumine-acide chlorhydrique nitreux*, par action directe sur le liquide de culture. En général, et surtout si l'on a pris la précaution d'ensemencer copieusement, avec un ferment jeune et actif, la réaction est positive vingt-quatre heures après l'ensemencement et la mise à l'étuve à  $25^{\circ}$ - $30^{\circ}$  : la proportion d'aldéhyde acrylique croît jusqu'à un maximum



de *dix centigrammes* environ par litre, atteint au bout de quelques jours; elle demeure ensuite stationnaire, puis diminue en même temps que l'activité cellulaire, qui se trouve paralysée par les acides formés. A la fin de la fermentation, au bout de deux semaines environ, la recherche de l'acroléine par action directe sur le liquide est généralement négative, mais on peut en retrouver des traces dans le premier fractionnement de distillation.

Dès le début de la fermentation, par exemple dix à douze heures après la mise à l'étuve, en tout cas avant que le réactif *protéique acide* puisse donner avec le liquide la coloration vert bleuâtre ou bleue, spéciale à l'acroléine, nous avons invariablement constaté la production d'une coloration rose violacée, laquelle est également due à une aldéhyde, car déjà à ce moment le liquide de culture recoloré aussi le réactif de Schiff. Cette aldéhyde, qui apparaît encore à la fin de la fermentation, est très vraisemblablement et pour les raisons d'identité développées dans la seconde partie de ce travail, le *propanolal 1.3* ou aldéhyde *hydracrylique*, dont la formation résulte d'une première phase dans la déshydratation de la glycérine.

Nous ne faisons que signaler ici ces résultats, nous réservant de réunir et de discuter dans un chapitre spécial, tous les faits que nous avons observés relativement à l'évolution de la glycérine et de ses produits successifs de déshydratation, au cours de l'action fermentaire exercée sur cette substance par le *Bacillus amaracrylus* retiré d'un vin amer, et par le bacille isolé de l'eau dont nous avons également à faire l'étude.

Comme ces actions sont comparables et que de plus certains des faits révélés par l'observation de la seconde, notamment ceux relatifs à la mise en évidence de ce propanolal dont il vient d'être question, ont servi de point de départ à la vérification des mêmes résultats dans la première; comme, en outre, le phénomène de déshydratation de la glycérine prime tous ceux qui, avec lui, ont servi de matière à notre travail, il nous a paru logique et nécessaire à la clarté de son exposé, et aussi pour rester fidèle à l'esprit de suite qui nous a guidé au cours de ces longues recherches, de grouper dans une étude comparative et presque terminale, les faits d'observation et de déduction ressortissant à ce phénomène.

# RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

|                                       |                       |                      |                                    |
|---------------------------------------|-----------------------|----------------------|------------------------------------|
| Glycérine transformée, pour cent..... |                       | 23.75                |                                    |
|                                       |                       | Par litre de culture | Pour cent de glycérine transformée |
| Gaz {                                 | H.....                | 204 <sup>cc</sup>    | 8588 <sup>cc</sup>                 |
|                                       | CO <sup>2</sup> ..... | 152 <sup>cc</sup>    | 6399 <sup>cc</sup>                 |
| Acidité, en acide acétique {          | totale ...            | ogr. 85              | 35gr.78                            |
|                                       | volatile..            | o 544                | 22 90                              |
|                                       | fixe .....            | o 292                | 12 12                              |
| Acides volatils {                     | formique.....         | o 180                | 7 52                               |
|                                       | acétique.....         | o 272                | 11 45                              |
|                                       | acrylique.....        | o 045                | 1 92                               |
| Acides fixes {                        | lactique .....        | o 255                | 10 72                              |
|                                       | succinique.....       | o 126                | 5 30                               |
| Alcool éthylique .....                |                       | o 38                 | 15 99                              |

## RENDEMENT

|                                |                       |       |                     |       |
|--------------------------------|-----------------------|-------|---------------------|-------|
| Gaz {                          | H.. .....             | 0.76  | }                   | 13.36 |
|                                | CO <sup>2</sup> ..... | 12.60 |                     |       |
| Acides volatils {              | formique..            | 7.52  | }                   | 20.89 |
|                                | acétique..            | 11 45 |                     |       |
|                                | acrylique.            | 1.92  |                     |       |
| Acides fixes {                 | lactique ..           | 10 72 | }                   | 16.02 |
|                                | succinique            | 5.30  |                     |       |
| Alcool éthylique .....         |                       | 15.99 |                     | 15.99 |
| Total des produits dosés ..... |                       | 66.26 | p. 100 de glycérine |       |

*Eléments non dosés.* — Acidité volatile insoluble; glycol triméthylénique; produits divers de transformation de l'aldéhyde hydracrylique et de l'acroléine; eau résultant de la déshydratation de la glycérine; matériaux de la substance fermentescible employés pour la multiplication et la nutrition microbiennes, etc.

Lorsque, dans l'étude de la fermentation de la glycérine en présence de carbonate de chaux, laquelle est beaucoup plus complète, souvent totale, et par suite se prête mieux au dosage de certains des éléments précités, nous aurons pu réduire d'autant le nombre de ces éléments quantitative-ment indéterminés, nous mettrons alors en relief l'importance que peut avoir l'un d'entre eux, difficilement évaluable, et qui est représenté par l'eau libérée de la glycérine par l'acte fermentaire.

## Fermentation de la Glycérine

EN MILIEU MINÉRAL SANS ADDITION DE CARBONATE DE CHAUX

Le bacille a été ensemencé dans le liquide minéral de Laurent glyciné à 10 grammes par litre, et préalablement stérilisé. Dans ce milieu de disette, le ferment se développe néanmoins bien à 30° : le liquide devient progressivement trouble ; son acidité, très faible au début et due au phosphate monopotassique, s'accroît en même temps qu'un dégagement gazeux régulier s'établit.

Un mois après l'ensemencement, les résultats de la fermentation, évalués à l'aide des méthodes d'analyse précédemment exposées, ont été les suivants.

### ANALYSE DES GAZ

Le dégagement gazeux est encore constitué par un mélange d'hydrogène et d'anhydride carbonique.

*Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures et gaz dissous.*  
par litre de culture :

|                                       | Volume            | CO <sup>2</sup>   | H                 |
|---------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 <sup>er</sup> fractionnement.....   | 29 <sup>cc</sup>  | 2 <sup>cc</sup>   | 27 <sup>cc</sup>  |
| 2 <sup>e</sup> — .....                | 60                | 10                | 50                |
| 3 <sup>e</sup> — .....                | 62                | 11                | 51                |
| 4 <sup>e</sup> — .....                | 47                | 9                 | 38                |
| 5 <sup>e</sup> — (durée 3 jours)..... | 15                | 3                 | 12                |
| Total des gaz dégagés.....            | 213 <sup>cc</sup> | 35 <sup>cc</sup>  | 178 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous.....                      | 117 <sup>cc</sup> | 105 <sup>cc</sup> | 12 <sup>cc</sup>  |
| Gaz engendrés par litre de culture    | 330 <sup>cc</sup> | 140 <sup>cc</sup> | 190 <sup>cc</sup> |

### ANALYSE DU LIQUIDE

Il présente une odeur légère, sudorale, rappelant celle de l'acide caprylique ; il ne possède aucun goût amer ; sa réaction est nettement acide.

*Proportion de glycérine consommée.* — Elle est de 21 pour 100.

### Etude de l'acidité.

ACIDITÉ TOTALE. — Elle équivaut à 0 gr. 80 d'acide acétique par litre du liquide de fermentation, soit à 38 gr. 09 de cet acide pour 100 grammes de glycérine consommée.

# ACIDITÉ VOLATILE

Le liquide de fermentation du volume de dix litres, soumis à la distillation suivant la méthode précédemment indiquée, donne un distillatum exhalant, surtout dès le début de l'opération, une odeur pénétrante d'acroléine, beaucoup plus accentuée que dans la culture en milieu peptoné.

La liqueur finale provenant de l'extraction des acides volatils est opalescente et possède une légère odeur sudorale. Comme dans le cas précédent, elle contient par ordre de grandeur décroissante les acides *acétique*, *formique*, *acrylique*, et des traces d'au moins un acide supérieur insoluble ou très peu soluble dans l'eau, en particulier de l'acide *caprylique* : acidité insoluble que, pour les raisons précédemment exposées, nous négligerons encore dans ce cas de fermentation très incomplète.

## Analyse quantitative des acides volatils.

*Acidité volatile totale.* — Le mélange de ces acides volatils, provenant de un litre de culture, possède une acidité équivalente à 0 gr. 521 d'acide acétique.

ACIDE FORMIQUE. — 0 gr. 163 par litre de culture.

ACIDE ACÉTIQUE. — Comme dans le cas précédent, il a été évalué après élimination des acides formique et acrylique et par deux méthodes différentes.

a) *Par titrage acidimétrique* : 0 gr. 262 par litre de culture.

b) *Par la méthode de Duclaux.*

| Fractionnements<br>de 10 cc. | Eau de chaux      | Fractionnements<br>totalisés | Eau de chaux      |
|------------------------------|-------------------|------------------------------|-------------------|
| 1 <sup>er</sup>              | 5 <sup>cc</sup> 7 | 10 premiers cmc.             | 5 <sup>cc</sup> 7 |
| 2 <sup>e</sup>               | 6. 4              | 20 —                         | 12. 1             |
| 3 <sup>e</sup>               | 6. 8              | 30 —                         | 18. 9             |
| 4 <sup>e</sup>               | 7. 1              | 40 —                         | 26. 0             |
| 5 <sup>e</sup>               | 7. 6              | 50 —                         | 33. 6             |
| 6 <sup>e</sup>               | 8. 1              | 60 —                         | 41. 7             |
| 7 <sup>e</sup>               | 8. 8              | 70 —                         | 50. 5             |
| 8 <sup>e</sup>               | 9. 7              | 80 —                         | 60. 2             |
| 9 <sup>e</sup>               | 10. 9             | 90 —                         | 71. 1             |
| 10 <sup>e</sup>              | 13. 1             | 100 —                        | 84. 2             |

A l'examen de ces nombres, on remarque comme précédemment que la progression de leur croissance n'est pas



régulière et qu'elle atteint un minimum vers le troisième terme. Cette irrégularité est due, ainsi que nous l'avons déjà expliqué, au passage dans le début de la distillation des traces d'acide supérieur que les traitements antérieurs n'ont pas éliminé. A partir du troisième fractionnement, la marche ascendante des nombres est régulière et correspond bien à celle que fournit une solution d'acide acétique.

L'eau de chaux employée étant telle que un centimètre cube sature 0 gr. 0027 d'acide acétique, cette équivalence permet d'évaluer la quantité de cet acide contenue dans les cent premiers centimètres cubes passés à la distillation par l'égalité

$$84.2 \times 0^{\text{gr}}.0027 = 0^{\text{gr}}.2273$$

soit pour la totalité de l'acide acétique du liquide soumis à la distillation et provenant de un litre de culture.

$$\frac{0^{\text{gr}}.2273 \times 100}{80} = 0^{\text{gr}}.284$$

Moyenne des deux résultats : 0 gr. 273 d'acide acétique par litre du liquide de fermentation.

*Estimation de l'acide acrylique.* — Par différence entre l'acidité volatile totale et l'acidité due à l'ensemble des acides formique et acétique :

|                                             |                                                     |       |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------|
| Acidité volatile totale en acide acétique,  | 0 <sup>gr</sup> .521                                |       |
| — formique —                                | 0 <sup>gr</sup> .163 × 1.304 = 0.212                |       |
| — acétique —                                |                                                     | 0.273 |
| Total des acidités formique et acétique,    |                                                     | 0.485 |
| Acidité <i>acrylique</i> en acide acétique, | 0 <sup>gr</sup> .521 — 0 <sup>gr</sup> .485 = 0.036 |       |
| — en acide acrylique,                       | 0 <sup>gr</sup> .036 × 1.2 = 0.043                  |       |

Soit 0 gr. 043 d'acide acrylique par litre du liquide de fermentation.

Nous devons rappeler encore ici que cette évaluation de l'acide acrylique est incertaine à la fois par son origine arithmétique et par la présence de traces d'acide supérieur.

#### ACIDITÉ FIXE

Le liquide restant après la séparation des produits volatils possède une réaction franchement acide au tournesol, même lorsque le milieu de culture a été préparé avec le phosphate bipotassique, alcalin à ce réactif. Il contient les *acides lactique* et *succinique*.

### *Analyse quantitative des acides fixes.*

Comme dans le cas précédent, nous avons effectué la séparation et le dosage de ces acides sur une solution alcoolique correspondant à un litre du liquide de fermentation.

#### **Dosage de l'acide succinique.**

Poids du succinate de baryte : 0<sup>gr</sup>.3321

*Transformation du succinate de baryte en sulfate de baryte :*

|                              | Trouvé                | Calculé               |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Poids du sulfate de baryte : | 0 <sup>gr</sup> .3070 | 0 <sup>gr</sup> .3058 |

Calcul de l'acide succinique :

Au moyen du succinate de baryte :  $0^{\text{gr}}.3321 \times 0,4664 = 0^{\text{gr}}.1548$

Au moyen du sulfate de baryte :  $0^{\text{gr}}.3070 \times 0,5064 = 0^{\text{gr}}.1554$

Soit, en moyenne, une quantité de 0<sup>gr</sup>.1552 d'acide succinique par litre du liquide de fermentation.

Acidité acétique équivalente :  $0^{\text{gr}}.1552 \times 1,016 = 0^{\text{gr}}.1577$ .

#### **Dosage de l'acide lactique.**

Poids du lactate de baryte anhydre : 0<sup>gr</sup>.304

*Transformation du lactate de baryte en sulfate de baryte :*

|                              | Trouvé                | Calculé               |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Poids du sulfate de baryte : | 0 <sup>gr</sup> .2312 | 0 <sup>gr</sup> .2248 |

Calcul de l'acide lactique :

Au moyen du lactate de baryte :  $0^{\text{gr}}.304 \times 0,5714 = 0^{\text{gr}}.1737$

Au moyen du sulfate de baryte :  $0^{\text{gr}}.2312 \times 0,7725 = 0^{\text{gr}}.1786$

soit, en moyenne, une quantité de 0<sup>gr</sup>.1761 d'acide lactique par litre du liquide de fermentation.

Acidité acétique équivalente :  $0^{\text{gr}}.1761 \times 0,644 = 0^{\text{gr}}.1132$ .

|                                | Trouvé                                                                | Calculé              |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Acidité fixe en acide acétique | 0 <sup>gr</sup> .271                                                  | 0 <sup>gr</sup> .279 |
|                                | 0 <sup>gr</sup> .1577 + 0 <sup>gr</sup> .1132 = 0 <sup>gr</sup> .2709 |                      |
|                                | 0 <sup>gr</sup> .80 — 0 <sup>gr</sup> .521 = 0 <sup>gr</sup> .279     |                      |

les nombres 0<sup>gr</sup>.80 et 0<sup>gr</sup>.521 représentant respectivement les valeurs de l'acidité totale et de l'acidité volatile, antérieurement déterminées.

### Recherche des alcools.

L'examen du fractionnement de distillation mis à part au moment de l'extraction des acides volatils, en vue de la recherche des alcools, montre qu'il contient de l'alcool éthylique.

Comme dans le cas précédent, le liquide résiduel renferme à côté des acides fixes et de la glycérine non transformée, une petite proportion de glycol triméthylénique.

*Dosage de l'alcool éthylique.* — Les méthodes d'analyse précédemment exposées donnent une quantité moyenne de 0<sup>cc</sup>50, soit 0<sup>gr</sup>.39 d'alcool éthylique par litre du liquide de fermentation.

### Recherche, dosage et variations de l'acroléine.

Cette étude particulière, en milieu minéral, a été suivie parallèlement et comparativement avec la précédente, en milieu peptoné ; elle présente toutes les observations constatées au cours de cette dernière : nous enregistrons seulement ici les différences essentielles, devant revenir sur cette question capitale dans un chapitre spécial.

En milieu exclusivement minéral, en raison de l'activité bactérienne moindre, la réaction de l'acroléine n'est positive que plusieurs jours après l'ensemencement : en général, l'aldéhyde acrylique décelable après vingt-quatre heures dans le milieu peptoné, ne l'est qu'après trois jours environ dans le milieu minéral, toutes conditions d'expérimentation et notamment d'ensemencement et de température étant identiques.

Les variations de l'acroléine sont analogues aux précédentes, mais avec un maximum plus grand, de *quinze centigrammes* par litre environ : c'est qu'en effet, si sa production est ralentie dans ce milieu de souffrance, elle se transforme aussi beaucoup moins vite que dans le milieu peptoné ; aussi, à la fin de la fermentation et souvent même assez longtemps après, la recherche de l'acroléine par action directe du réactif *protéique acide* sur le liquide est positive, et dans la séparation des produits volatils, le distillatum, au moins au début de l'opération, exhale l'odeur irritante de cette substance.

# RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

|                                       |                         |                      |                                    |
|---------------------------------------|-------------------------|----------------------|------------------------------------|
| Glycérine transformée, pour cent..... |                         |                      | 21                                 |
|                                       |                         | Par litre de culture | Pour cent de glycérine transformée |
| Gaz                                   | { H .....               | 190 <sup>cc</sup>    | 90 <sup>44</sup> <sup>cc</sup>     |
|                                       | { CO <sup>2</sup> ..... | 140 <sup>cc</sup>    | 666 <sup>4</sup> <sup>cc</sup>     |
| Acidité, en acide acétique.           | { totale....            | 0 <sup>gr</sup> .800 | 38 <sup>gr</sup> .09               |
|                                       | { volatilè..            | 0 521                | 24 80                              |
|                                       | { fixe.....             | 0 271                | 12 90                              |
| Acides volatils                       | { formique .....        | 0 163                | 7 76                               |
|                                       | { acétique.....         | 0 273                | 12 99                              |
|                                       | { acrylique.....        | 0 043                | 1 05                               |
| Acides fixes                          | { lactique .....        | 0 176                | 8 38                               |
|                                       | { succinique.....       | 0 155                | 7 22                               |
| Alcool éthylique....                  |                         | 0 390                | 18 56                              |

## RENDEMENT

|                               |                         |       |                     |       |
|-------------------------------|-------------------------|-------|---------------------|-------|
| Gaz                           | { H .....               | 0.80  | }                   | 13.92 |
|                               | { CO <sup>2</sup> ..... | 13.12 |                     |       |
| Acides volatils               | { formique...           | 7.76  | }                   | 21.80 |
|                               | { acétique..            | 12.99 |                     |       |
|                               | { acrylique..           | 1.05  |                     |       |
| Acides fixes                  | { lactique ...          | 8.38  | }                   | 15.60 |
|                               | { succinique..          | 7.22  |                     |       |
| Alcool éthylique.....         |                         | 18.56 |                     | 18.56 |
| Total des produits dosés..... |                         | 69.88 | p. 100 de glycérine |       |

*Eléments non dosés.* -- Comme dans la fermentation précédente, ces éléments comprennent : Acidité volatile insoluble ; glycol triméthylénique ; produits divers de transformation de l'aldéhyde hydraacrylique et de l'acroléine ; eau résultant de la déshydratation de la glycérine ; matériaux de la substance fermentescible employés pour la multiplication et la nutrition microbiennes, etc.

Dans l'étude qui suit, de la fermentation de la glycérine en présence de carbonate de chaux, nous allons pouvoir évaluer l'acidité volatile insoluble et le glycol triméthylénique, ce qui réduira d'autant le nombre de ces éléments non justiciables de l'analyse quantitative dans les conditions



précédentes de fermentation très incomplète : en même temps, nous ferons ressortir théoriquement l'importance de l'un d'entre eux, pratiquement indosable, et qui est représenté par l'eau libérée de la glycérine dans la transformation de cette substance par voie de déshydratation.

Comparaison et discussion des résultats de fermentation de la Glycérine  
en milieu peptoné ou purement minéral sans carbonate de chaux.

Les différences essentielles constatées se rapportent à l'acidité totale et à l'alcool éthylique dont les chiffres sont légèrement plus élevés en milieu minéral qu'en milieu peptoné.

La majoration de l'acidité se répartit à la fois entre l'acidité volatile et l'acidité fixe. En ce qui concerne la première, il est fréquent que les quantités d'acides volatils soient plus grandes, pour des poids donnés de matière fermentescible et de ferment, lorsque le milieu est peu favorable que lorsqu'il est très nutritif. Relativement à l'acidité fixe, la majoration porte uniquement sur l'acide succinique, la proportion d'acide lactique étant même moindre en milieu minéral qu'en milieu peptoné.

### Fermentation de la Glycérine

#### EN MILIEU MINÉRAL ET EN PRÉSENCE DE CARBONATE DE CHAUX

Nous venons de voir qu'en milieu peptoné ou en milieu purement minéral, la fermentation de la glycérine est très incomplète et que plus des trois quarts de la quantité de cette substance introduite dans le vase de culture échappe à la transformation.

Cet arrêt de la fermentation doit être attribué à la double influence paralysante des acides engendrés et des aldéhydes résultant de la déshydratation de la glycérine, notamment de l'aerolcine. Nous avons cherché à rendre le phénomène plus complet en supprimant la première de ces causes par l'addition préalable d'un excès de carbonate de chaux dans le vase à fermentation.

Comme les résultats analytiques sont sensiblement les mêmes en milieu minéral qu'en milieu peptoné et que le fer-

ment s'accommode très bien d'un liquide de culture ne renfermant comme carbone alimentaire que celui apporté par la matière fermentescible, nous reproduirons seulement ici les détails de l'étude de la fermentation de la glycérine en milieu minéral et en présence de carbonate de chaux. Un tel milieu nutritif, de composition chimique initiale constante et bien définie, nous a rendu de grands services pour l'étude physiologique de ce ferment. Ces conditions de culture facilitent la reconnaissance des modifications que l'espèce bactérienne fait subir à la composition chimique du milieu, à la matière fermentescible, et de l'influence que certaines substances peuvent avoir sur la vitalité de l'espèce : en particulier, l'absence dans le milieu de culture d'une matière organique, comme la peptone, de qualité très variable, souvent acide, et de ses dérivés, est avantageuse pour la séparation des acides, notamment pour l'extraction des acides fixes. Un tel milieu nous a servi également pour l'étude de la fermentation des matières sucrées.

Le milieu minéral employé est toujours celui de Laurent : on lui ajoute, par litre, dix grammes de glycérine pure et le liquide est réparti pour la stérilisation dans des flacons de un litre, dans lesquels on a introduit au préalable dix grammes de carbonate de chaux pur. Après ensemencement et remplissage des flacons, ceux-ci sont fermés par un bon bouchon de caoutchouc muni d'un tube abducteur, la fermeture étant rendue hermétique par un joint de paraffine : la culture est placée à l'étuve à la température de 30°, le tube abducteur se rendant sur une cuve à mercure, au-dessous d'une éprouvette graduée. Au bout de deux jours, le dégagement gazeux se manifeste et s'accélère bientôt : il est étudié méthodiquement au fur et à mesure de sa production : un mois après l'ensemencement, nous avons procédé à l'examen des résultats de la fermentation,

#### ANALYSE DES GAZ

Les volumes mesurés suivants représentent les quantités de gaz recueillis par périodes de vingt-quatre heures, et par litre de culture, sauf pour le dernier fractionnement correspondant à une durée de plusieurs jours.

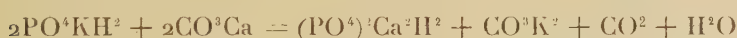
*Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures et gaz dissous, par litre de culture :*

|                                        | Volume             | CO <sub>2</sub>    | H                 |
|----------------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| 1 <sup>er</sup> fractionnement. ....   | 480 <sup>cc</sup>  | 220 <sup>cc</sup>  | 260 <sup>cc</sup> |
| 2 <sup>e</sup> — ..... 537             | 537                | 242                | 295               |
| 3 <sup>e</sup> — ..... 463             | 463                | 238                | 225               |
| 4 <sup>e</sup> — ..... 310             | 310                | 182                | 128               |
| 5 <sup>e</sup> — (durée : 5 jours) 105 | 105                | 69                 | 36                |
| Total des gaz dégagés .....            | 1895 <sup>cc</sup> | 951 <sup>cc</sup>  | 944 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous.....                       | 531 <sup>cc</sup>  | 516 <sup>cc</sup>  | 15 <sup>cc</sup>  |
| Gaz engendrés, par litre de culture    | 2426 <sup>cc</sup> | 1467 <sup>cc</sup> | 959 <sup>cc</sup> |

#### Acide carbonique provenant du carbonate de chaux.

Le dosage du carbonate de chaux restant après l'opération permet d'évaluer par différence la quantité transformée à 4 gr. 12. Ce nombre comprend non seulement le carbonate de chaux dissous par les acides engendrés, mais aussi celui décomposé par les substances salines du milieu de culture au moment de la stérilisation et même pendant la durée de cette culture. Ces substances salines capables d'agir sur le carbonate de chaux sont le phosphate monopotassique et le sulfate d'ammoniaque : voyons d'abord l'action du phosphate de potasse.

Ce sel possède encore deux fonctions acides de la molécule phosphorique, dont l'une est capable de décomposer le carbonate de chaux, acidité provoquant les réactions successives suivantes :



dont le bilan est représenté par l'équation finale



Le poids moléculaire du phosphate monopotassique étant  $\text{PO}^4\text{KH}^2 = 136$ , celui du carbonate de chaux  $\text{CO}^3\text{Ca} = 100$ , il s'ensuit que d'après cette équation la quantité de 0 gr. 75 de phosphate de potasse par litre de culture est capable de décomposer 0 gr. 27 de carbonate de chaux, décomposition qui devient effective lorsque la neutralisation de cette seconde fonction acide de la molécule phosphorique est intégrale. Ce résultat ainsi prévu par la théorie se trouve

très sensiblement vérifié par l'expérience, et comme cette quantité de carbonate de chaux décomposée par l'acidité propre du milieu de culture est appréciable, nous devons en tenir compte dans toutes nos fermentations effectuées en présence de cet agent de saturation. Elle correspond à 60<sup>cc</sup> de gaz carbonique dont l'abandon entrainerait une égale diminution dans le volume de ce gaz réellement dégagé au cours de l'action fermentaire. La quantité de gaz carbonique ainsi libérée du carbonate de chaux par une cause étrangère au travail microbien ne serait même pas négligeable avec une dose moindre de phosphate monopotassique; cependant, en consultant des travaux antérieurs de fermentations faites dans des conditions analogues, nous n'avons jamais reconnu qu'il en ait été tenu compte, au moins d'une façon explicite.

Examinons maintenant quelle peut être l'action décomposante du sulfate d'ammoniaque sur le carbonate de chaux. Cette action, qui paraît surprenante à première réflexion, se manifeste cependant en réalité et son degré d'importance est proportionnel à la durée de la stérilisation, que celle-ci soit obtenue par ébullition prolongée et renouvelée du liquide ou par chauffage à l'autoclave : elle est une conséquence de la dissociation des sels ammoniacaux en dissolution, même à basse température.

En particulier, quand on chauffe une solution de sulfate d'ammoniaque, même très diluée, il se manifeste, bien avant l'ébullition, un dégagement d'ammoniaque et la liqueur prend en même temps une réaction acide : c'est ainsi que notre liquide de culture, contenant seulement 4 gr. 70 de sulfate ammonique par litre, donne cette double réaction et qu'un papier rouge de tournesol, suspendu dans l'axe du ballon où on le chauffe, bleuit déjà, alors que le thermomètre n'accuse qu'une température de 35° à 40°. Cette remarque est importante, car une telle propriété permet de se rendre compte de l'état en quelque sorte permanent de dissociation du sulfate d'ammoniaque, non seulement au cours de l'opération de stérilisation, mais encore pendant la longue période culturale.

Néanmoins, la proportion de carbonate de chaux décomposée par l'acidité sulfurique résultant de cette dissociation est toujours minime et peut être négligée. D'ailleurs,



dans toute fermentation, on ne peut prétendre à dénombrer exactement l'ensemble des effets produits par toutes les causes entrant en jeu, qu'elles soient étrangères ou dépendantes de la vie et du travail du ferment : en particulier, et puisque nous nous efforçons de tenir une comptabilité aussi voisine que possible de la vérité, en ce qui concerne l'acide carbonique, ne devrions-nous pas tenir compte également de la quantité, si minime soit-elle, de ce gaz émis par le bacille dans son acte respiratoire ?

En nous bornant à l'action exercée par le phosphate monopotassique, capable de décomposer 0 gr. 27 de carbonate de chaux, et sachant que la quantité totale transformée est égale à 4 gr. 12, la différence, 4 gr. 12 - 0 gr. 27 = 3 gr. 85, représente la proportion de cet agent de neutralisation dissoute par les acides engendrés dans un litre de culture. Elle correspond à la mise en liberté de 858<sup>cc</sup> de gaz carbonique : en retranchant ce volume de celui de l'acide carbonique total, on obtient en définitive les évaluations suivantes pour le dégagement gazeux dans cette fermentation de la glycérine :

$$\text{CO}^2 = 609^{\text{cc}}$$

$$\text{H} = 959^{\text{cc}}$$

#### ANALYSE DU LIQUIDE

Il présente une légère odeur rappelant celle de l'acide caprylique ; il n'a aucun goût amer : sa réaction est neutre à l'orangé et il colore le tournesol en rouge vineux.

*Proportion de glycérine consommée.* — Elle est de 100 pour 100.

#### Séparation des acides volatils et des acides fixes

Le liquide de fermentation provenant de un litre de culture a été isolé par décantation et filtration du dépôt constitué principalement par le carbonate de chaux résiduel, lequel a été ensuite épuisé par l'eau bouillante. Le mélange du liquide primitif et des eaux de lavage du dépôt a été additionné de cinq grammes d'acide oxalique, quantité plus que suffisante pour précipiter la chaux contenue dans la dissolution ou, plus exactement, pour libérer de leurs combinaisons salines la totalité des acides engendrés, mais ne laissant subsister après cette action qu'une légère acidité oxa-

lique. Puis, sans effectuer la séparation de l'oxalate de chaux, dont le précipité pourrait retenir un acide insoluble, nous avons procédé à l'isolement des acides volatils.

#### ACIDITÉ VOLATILE

Le liquide a été distillé d'abord directement, de manière à le réduire au volume primitif de un litre environ, et l'opération a été continuée à l'aide d'un courant de vapeur d'eau, jusqu'à obtention d'un volume total de distillatum égal à six litres : le liquide restant dans le ballon est filtré et mis à part pour l'extraction des acides fixes. Le liquide distillé est trouble, surtout au début, et à cette période, il possède très nettement l'odeur d'acroléine.

Au cours de cette opération, on observe d'une façon plus accentuée que dans les précédentes le passage à la distillation de produits insolubles à réaction acide, formant comme un léger voile blanchâtre et parfois des gouttelettes fines huileuses, à la surface du liquide condensé. Dans certains cas même, en effectuant cette distillation pendant l'hiver, la température de l'eau du réfrigérant étant alors inférieure à 10°, nous avons constaté la formation d'un léger enduit pâteux, ressemblant à de la paraffine à demi concrétée, à l'extrémité inférieure du réfrigérant et sur le col du ballon de condensation. A la fin de l'opération, il est alors nécessaire d'arrêter la circulation d'eau froide pour permettre la fusion et l'entraînement de la totalité de cette matière volatile dans le ballon.

Le liquide obtenu dans cette distillation a été filtré ; opération qui peut être faite immédiatement en recueillant le distillatum sur un petit entonnoir muni d'un filtre. Le filtratum saturé par l'eau de baryte; évaporé d'abord par distillation, afin de pouvoir procéder au dosage de l'alcool dans le fractionnement condensé, puis au bain-marie, a donné un résidu d'où les acides volatils ont été extraits à nouveau par distillation en présence d'acide phosphorique. Ce second distillatum a été recueilli sur le même filtre que le premier : l'opération une fois terminée, on a lavé le filtre avec un peu d'eau qui a été recue dans le récipient contenant les acides volatils.

### Etude de l'acidité volatile insoluble.

Le léger dépôt retenu par le filtre est constitué par deux acides, l'un très faiblement soluble dans l'eau, l'autre soluble dans l'alcool, mais surtout dans l'éther de pétrole ou la benzine : il contient également une trace d'une substance à réaction neutre, produit volatil de sécrétion du bacille ou peut-être alcool supérieur.

*Recherche de l'acide caprylique.* — Si la proportion de ces acides est toujours minime, elle est de plus très variable avec chaque fermentation. Dans plusieurs essais effectués avec 30 gr. de glycérine par litre de culture, nous estimons avoir pu reconnaître l'acide caprylique dans le produit soluble dans l'eau chaude : la solution aqueuse neutralisée par la baryte et évaporée au bain-marie, nous a donné en effet un résidu cristallisé en petites lamelles brillantes à éclat nacré, gras, et de cette petite quantité de sel nous avons pu extraire une trace d'un acide se solidifiant au voisinage de 15°, mais dont la minime quantité ne nous a pas permis d'en faire l'analyse élémentaire.

Ajoutons que l'opération elle-même et l'examen des nombres représentant les volumes d'eau de chaux nécessaires à la saturation des fractionnements successifs de 10<sup>cc</sup> dans le dosage de l'acide acétique, suivant la méthode de Duclaux, permettent de reconnaître qu'après la séparation des acides formique et acrylique, il reste dans la liqueur aqueuse, avec l'acidité acétique, une impureté représentant un acide supérieur peu soluble dans l'eau.

En effet, bien que la liqueur primitive de distillation, du volume de 110<sup>cc</sup>, soit parfaitement limpide, les fractionnements initiaux de cette opération d'analyse immédiate sont toujours louches, opalescents ; ils ne deviennent clairs qu'à partir du deuxième ou du troisième terme. De plus, si ce liquide était constitué uniquement par un mélange d'eau et d'acide acétique, les quantités de chaux nécessaires à la neutralisation devraient être régulièrement croissantes : or, en consultant le tableau des nombres représentant ces quantités, on reconnaît invariablement que l'accroissement passe par un minimum, demeure presque stationnaire au niveau du deuxième ou troisième fractionnement, et qu'à partir de ce terme, la courbe de distillation correspond à

celle d'une solution aqueuse d'acide acétique. Cette irrégularité dans l'accroissement des quantités d'eau de chaux saturantes, suffit à elle seule à révéler la présence dans la solution d'une trace d'un acide supérieur, lequel passe à la distillation dans les premiers fractionnements, alors que l'acide acétique, suivant une loi inverse, se concentre dans le liquide du ballon : il en résulte qu'à un moment donné, et pour deux fractionnements voisins, l'acidité totale est à peu près équivalente, le premier contenant plus d'acide supérieur et moins d'acide acétique, le second ayant une composition inverse.

Une solution aqueuse d'acide acétique saturée d'acide caprylique, à la température ordinaire, possède une loi de distillation semblable : en particulier, si dans 110<sup>cc</sup> d'une solution d'acide acétique, renfermant 0 gr. 944 de cet acide, quantité trouvée dans un litre du liquide de fermentation actuel, on dissout une goutte d'acide caprylique, proportion voisine de celle qui est nécessaire pour la saturation à la température ordinaire de la liqueur par cet acide, la courbe de distillation de ce mélange est très rapprochée de celle qui nous a été fournie par le dosage de l'acide acétique dans notre liquide de fermentation, et dont les résultats sont inscrits plus loin.

En résumé les faits observés qui nous ont conduit à reconnaître l'acide caprylique comme élément principal de l'acidité volatile insoluble sont les suivants :

1° Dans le mélange des acides volatils, il passe le premier à la distillation, au moins en majeure partie, et il se solidifie dans le tube du réfrigérant en donnant un léger enduit en feuillets ressemblant à de la paraffine ou à des cristaux de cholestérine, fusible vers 15° : de ce fait, les premières portions du distillatum sont troubles, opalescentes, et à la surface du liquide on observe même la présence de quelques fines gouttelettes huileuses.

2° Ces premières portions exhalent une odeur sudorale particulière à l'acide caprylique.

3° Cet acide étant légèrement soluble dans l'eau, l'étude du distillatum suivant la méthode de Duclaux pour la recherche des acides volatils, montre que ce liquide préalablement privé des acides formique et acrylique, se comporte



comme un mélange d'acide acétique avec des traces d'acide caprylique.

4° Enfin, nous avons pu isoler des produits volatils insolubles recueillis par filtration, une minime quantité d'un acide se solidifiant vers 15° et dont le sel de baryum présente les caractères de celui de l'acide caprylique.

En raison de ces faits, cet acide nous servira à représenter cette acidité volatile insoluble.

#### Dosage de l'acidité volatile insoluble.

D'après ce qui précède, nous avons dû comprendre deux parts dans l'évaluation de l'acidité volatile : l'acidité insoluble et l'acidité soluble.

Pour estimer la première, nous avons recueilli dans l'extraction des acides volatils, le liquide de distillation sur un entonnoir recouvert d'un petit filtre mouillé : après l'opération, ce filtre est immergé dans l'alcool chaud, bien neutre, et la liqueur est titrée à l'eau de chaux, en présence de la phtaléine. Dans l'impossibilité de faire la séparation entre ces traces d'acides insolubles nous avons simplement évalué leur acidité totale en acides acétique et caprylique. De même, et vu sa trop minime quantité, nous avons renoncé à faire la détermination de l'acidité supérieure existant en dissolution dans le mélange des acides volatils et que nous attribuons à de l'acide caprylique : à ce sujet nous devons nous rappeler que cette trace d'acidité accompagnera l'acide acétique dans son dosage, et qu'elle majorera très légèrement la quantité réelle de cet acide, au moins dans son dosage par voie acidimétrique.

Acidité *volatile insoluble*, en acide acétique : 0 gr. 048 par litre de culture ; soit en acide caprylique :

$$0\text{ gr. }048 \times \frac{144}{60} = 0\text{ gr. }048 \times 2.4 = 0\text{ gr. }115.$$

#### Acidité volatile soluble.

Le deuxième distillatum précédemment obtenu dans l'extraction des acides volatils, contient les acides *formique*, *acétique*, *acrylique*, avec une trace d'acide *caprylique*.

*Acidité totale.* — L'acidité de ce mélange, provenant de un litre de culture, équivaut à 1 gr. 983 d'acide acétique.

**ACIDE FORMIQUE.** — 0 gr. 69 par litre de culture.

**ACIDE ACÉTIQUE.** — Comme dans les fermentations précédentes, il a été évalué après élimination des acides formique et acrylique, et par deux méthodes différentes.

a) *Par titrage acidimétrique.* — 0 gr. 956 par litre de culture.

b) *Par la méthode de Duclaux :*

| Fractionnements<br>de 10 <sup>e</sup> | Eau de chaux       | Fractionnements<br>totalisés | Eau de chaux       |
|---------------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|
| 1 <sup>er</sup>                       | 22 <sup>cc</sup> 4 | 10 premiers cmc              | 22 <sup>cc</sup> 4 |
| 2 <sup>e</sup>                        | 23 4               | 20 —                         | 45 8               |
| 3 <sup>e</sup>                        | 23 5               | 30 —                         | 69 3               |
| 4 <sup>e</sup>                        | 24                 | 40 —                         | 93 3               |
| 5 <sup>e</sup>                        | 24 8               | 50 —                         | 118 1              |
| 6 <sup>e</sup>                        | 25 8               | 60 —                         | 143 9              |
| 7 <sup>e</sup>                        | 26 9               | 70 —                         | 170 8              |
| 8 <sup>e</sup>                        | 28 5               | 80 —                         | 199 3              |
| 9 <sup>e</sup>                        | 30 6               | 90 —                         | 229 9              |
| 10 <sup>e</sup>                       | 34 5               | 100 —                        | 264 4              |

L'inspection de ces nombres montre bien l'irrégularité déjà signalée dans l'accroissement des quantités d'eau de chaux saturantes, et révélant la présence dans la solution d'une trace d'acide supérieur.

L'eau de chaux employée étant telle que un centimètre cube sature 0 gr. 00282 d'acide acétique, cette équivalence permet d'évaluer la quantité de cet acide contenue dans les cent premiers centimètres cubes, par l'égalité

$$264.4 \times 0.00282 = 0.7456$$

soit pour la totalité de l'acide acétique du liquide soumis à la distillation et provenant de un litre de culture :

$$\frac{0.7456 \times 100}{80} = 0.932$$

*Moyenne des deux résultats:* 0 gr. 944 d'acide acétique, par litre du liquide de fermentation.

*Estimation de l'acide acrylique.* — Par différence entre l'acidité volatile soluble totale et l'acidité due à l'ensemble des acides formique et acétique :

|                                                      |                              |
|------------------------------------------------------|------------------------------|
| Acidité volatile soluble totale, en acide acétique : | 1 gr. 983                    |
| — formique —                                         | 0 gr. 69 × 1.304 = 0.899     |
| — acétique —                                         | 0.944                        |
| Total des acidités formique et acétique.....         | 1.843                        |
| Acidité <i>acrylique</i> , en acide acétique...      | 1 gr. 983 — 1 gr. 843 = 0.14 |
| — acrylique..                                        | 0 gr. 14 × 1.2 = 0.168       |

soit 0 gr. 168 d'acide acrylique par litre de culture.

Il est nécessaire de rappeler à nouveau que cette évaluation de l'acide acrylique est incertaine à la fois par son caractère arithmétique et par la présence de traces d'acide supérieur.

Acidité *volatile totale* (soluble et insoluble), en acide acétique, par litre du liquide de fermentation :

$$1 \text{ gr. } 983 + 0 \text{ gr. } 048 = 2 \text{ gr. } 031$$

#### ACIDITÉ FIXE

L'analyse qualitative de la liqueur résiduelle de séparation des acides volatils révèle la présence des acides *lactique et succinique* : elle contient en outre une très légère quantité d'acide oxalique ajouté en excès pour la libération des acides de leurs combinaisons calciques ou salines en général.

#### *Analyse quantitative des acides fixes.*

On prélève le dixième du volume de cette liqueur et on l'évapore, d'abord au bain-marie jusqu'à réduction à un volume d'environ dix centimètres cubes, puis on termine l'évaporation dans le vide en évitant de prolonger son action et en s'arrêtant dès qu'on juge le départ de l'eau effectué : ces précautions opératoires sont nécessaires à observer en raison de la volatilisation appréciable de l'acide lactique, soit au bain-marie à 100°, soit même dans le vide à la température ordinaire, au fur et à mesure de la concentration de ses dissolutions, ainsi que nous l'avons déjà fait remarquer. On obtient alors un résidu cristallin blanc imprégné d'un liquide sirupeux, légèrement jaunâtre.

Ce résidu, trituré avec du sable, est épuisé complètement par l'éther. Après récupération de la majeure partie de ce dissolvant par distillation, le liquide restant abandonne à l'évaporation un mélange renfermant les acides lactique et succinique, avec une petite quantité d'acide oxalique.

Cette impureté oxalique aurait pu être évitée en ajoutant primitivement, et selon la méthode classique, la quantité de cet acide seulement suffisante pour précipiter la chaux dissoute par les acides nés au cours de la fermentation ; mais cette précipitation exacte demande de l'attention et est délicate à réaliser sans excès dans un sens ou dans l'autre, lorsqu'on l'opère, comme dans le cas présent, avec une liqueur toujours trouble.

Il est plus commode et plus élégant de ne pas mesurer rigoureusement l'acide oxalique, d'en ajouter un léger excès et d'évaluer ensuite sa proportion figurant comme impureté dans le mélange des acides à doser. Connaissant la quantité de chaux dissoute, on sera toujours maître de réduire cette impureté oxalique à une faible proportion : on arrivera aussi à ce but en ayant soin de ne pas trop prolonger l'épuisement par l'éther, en se rappelant que l'acide lactique est très soluble dans ce véhicule, que l'acide succinique s'y dissout dans la proportion de 1<sup>p</sup> pour 80<sup>p</sup>, et qu'enfin l'acide oxalique est fort peu soluble dans ce dissolvant.

Il est d'ailleurs nécessaire, au moins dans le cas actuel et dans la plupart des exemples de fermentation s'accomplissant en présence de carbonate de chaux, d'ajouter un excès d'acide oxalique pour être certain de libérer complètement les acides nés au cours de la fermentation, en raison des réactions secondaires s'exerçant entre les sels de chaux de ces acides et les substances salines constituant le milieu de culture, notamment les phosphates alcalins : cette nécessité résulte aussi de l'état permanent de dissociation des sels ammoniacaux, le plus souvent présents dans ce liquide.

En particulier, notre milieu de culture contient du phosphate bipotassique ; que le sel de potasse soit ajouté sous cette forme dès le début, ou sous forme de phosphate monopotassique : avec ce dernier produit que nous avons toujours employé, il y a d'abord saturation de la deuxième fonction acide de l'acide phosphorique par décomposition d'une quantité correspondante de carbonate de chaux, satu-



ration qui aboutit à la précipitation d'une partie de l'acide phosphorique sous forme de phosphate bicalcique, l'autre partie restant en dissolution à l'état de phosphate bipotassique.

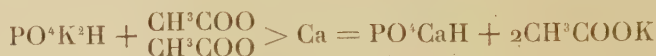
Lorsque les proportions relatives de phosphate monopotassique et de carbonate de chaux en présence correspondent à celles qui figurent dans le premier membre de l'équation inscrite et commentée plus haut (page 85), et qui traduit chimiquement l'ensemble des réactions que nous venons d'énoncer, la répartition de l'acide phosphorique se fait sensiblement par moitié entre la chaux et la potasse, et la liqueur filtrée précipite nettement par le molybdate d'ammoniaque : cette équation permet d'évaluer à 0 gr. 48 la quantité de phosphate neutre de potasse ainsi engendrée par la présence de 0 gr. 75 de sel monopotassique.

Quand le carbonate de chaux est en excès par rapport au phosphate, la proportion d'acide phosphorique dissoute sous forme de sel potassique va en diminuant en raison de la solubilité du carbonate de chaux, qui n'est pas négligeable, dans l'eau bouillante, et que la présence d'un sel ammoniacal dans le milieu de culture contribue encore à augmenter. En sorte que, après stérilisation d'un tel milieu, la majeure partie de l'acide phosphorique se trouve précipitée sous forme de phosphate bicalcique et la liqueur ne donne plus qu'un léger trouble ou une simple coloration par le réactif molybdiqué. Néanmoins, dans la plupart des cas, l'opération de la stérilisation n'ayant pas été prolongée, le milieu contiendra en dissolution une petite quantité de phosphate bipotassique qui pourra ne pas être négligeable, surtout si l'acide phosphorique a été introduit primitivement sous cette forme de sel bibasique.

Cela exposé, considérons le sort de l'acide acétique dans le cours de la fermentation : au fur et à mesure de sa formation, il devient acétate de calcium, sel soluble, qui fait la double décomposition avec le phosphate bipotassique, de laquelle résulte de l'acétate de potassium soluble et du phosphate bicalcique insoluble. Si donc, pour libérer les acides, on n'ajoutait que la stricte quantité d'acide oxalique nécessaire à la précipitation de la chaux qu'ils ont fait entrer en dissolution, on serait certain, dans l'extraction des acides volatils, de laisser dans le ballon de distillation au moins

une partie de l'acide acétique combiné à l'état d'acétate alcalin.

L'équation qui représente la double décomposition entre le phosphate neutre de potasse et l'acétate de calcium est la suivante :



elle exprime que la quantité de 0 gr. 48 de phosphate bipotassique, qui peut être subséquemment formée dans un litre de notre milieu de culture, contribuerait, si l'acide acétique était seul, à la production d'une quantité d'acétate de potasse correspondant à 0 gr. 32 d'acide acétique ; proportion très notable représentant le tiers de la quantité engendrée, et qui cependant resterait non dosée, si l'on s'en tenait, pour la régénération de cet acide, à la méthode classique de précipitation exacte par l'acide oxalique, de la chaux dissoute.

La même observation s'applique évidemment à l'acide formique et encore aux acides lactique et succinique, en ce qui concerne les acides fixes : si tous naissent simultanément, il est même vraisemblable que le sel de calcium de chacun d'eux intervient pour sa part dans la double décomposition avec le phosphate de potasse, et qu'une quantité correspondante resterait combinée à l'état de sel alcalin, par suite non dosée, si l'on bornait la régénération à une précipitation rigoureuse de la chaux par l'acide oxalique, sans ajouter un léger excès de ce réactif.

En résumé, dans toutes les fermentations s'effectuant en présence de carbonate de chaux et dont les milieux de culture comportent parmi leurs constituants un sel soluble d'un acide formant avec la chaux un composé insoluble, l'acide phosphorique ou l'acide tartrique, par exemple, il sera généralement nécessaire, pour remettre en liberté dans leur totalité les acides engendrés au cours de la fermentation, d'ajouter un excès d'un acide fixe, ou plus explicitement une quantité de cet acide supérieure à celle qui doit servir à précipiter la chaux entrée en dissolution. Or, de tels milieux sont la grande majorité ; que l'acide phosphorique y entre : soit à l'état de sel disodique ; soit à l'état de sel de potasse, monométallique ou bimétallique ; soit à l'état de phosphate d'ammoniaque : que l'acide tartrique y figure

à l'état de sel de Seignette ou de tartrate d'ammoniaque. Cependant, en parcourant diverses études de fermentations effectuées dans ces conditions, nous n'avons pu reconnaître l'indication de cette précaution particulière.

Connaissant la nature du sel, phosphate, tartrate, etc., et sa proportion introduite dans le milieu nutritif, on peut même calculer la quantité maxima d'un acide fixe à ajouter en supplément de celle nécessaire à la précipitation de la chaux, pour libérer les acides de leurs combinaisons alcalines résultant de telles réactions secondaires. En particulier, dans le cas actuel, la quantité d'acide oxalique suffisante pour effectuer ce complément d'action sera celle qui est capable de saturer la potasse contenue dans 0 gr. 48 de phosphate bipotassique, soit 0 gr. 35 d'acide oxalique cristallisé.

Mais, si dans certains cas, il peut être indispensable de connaître la quantité exacte d'un acide, étranger à la fermentation, à ajouter pour remettre en liberté la totalité des acides qu'elle a engendrés ; si cette quantité ainsi calculée doit toujours servir de guide utile dans cette introduction ; dans la plupart des cas, et notamment dans celui qui nous occupe, on pourra, en employant un acide convenablement choisi, en ajouter un léger excès et le doser ensuite, ainsi que nous l'expliquons dans ce qui suit. La faculté d'employer un excédent de substance réagissante et de pouvoir en évaluer le reste est avantageuse dans toute opération de ce genre, où les réactions secondaires prévues peuvent ne pas être toujours intégrales.

Dans le cas actuel, non seulement la présence d'un phosphate mono ou bi-métallique intervient pour empêcher la séparation de la totalité des acides engendrés à l'état de sels uniquement calciques, mais les sels ammoniacaux jouent aussi un rôle analogue par suite de leur état de dissociation constant dans le milieu de culture, décomposition précédemment rappelée. A tout instant, soit au cours de la stérilisation, soit pendant le long séjour à l'étuve, il naît de l'ammoniaque dans ce milieu riche en sulfate de cette base, et la preuve immédiate en est que ce liquide possédant primitivement une réaction acide lorsqu'il a été préparé avec le phosphate monopotassique, acquiert une réaction nettement alcaline due non seulement à du carbonate de chaux dissous, mais aussi et surtout à la présence d'un peu d'am-

moniaque ou de carbonate d'ammoniaque. Il en résulte qu'une faible partie au moins de l'acidité engendrée s'unit à cette base, et pour cette raison encore, il est nécessaire de ne pas viser uniquement sa combinaison calcique dans la remise en liberté de cette acidité.

Parmi les acides régénérateurs, le choix de l'acide oxalique est imposé par les propriétés avantageuses suivantes :

a) L'acide oxalique est le plus fort des acides organiques connus : il déplace tous les autres de leurs combinaisons salines ; il déplace même certains acides minéraux, comme l'acide chlorhydrique du sel marin.

b) L'acide oxalique est fort peu soluble dans l'éther, véhicule qui sert généralement à l'épuisement des résidus dans la séparation et le dosage des acides fixes.

c) L'acide oxalique peut être précipité totalement de ses dissolutions aqueuses ou alcooliques. Il réagit facilement et nettement avec les agents oxydants, en particulier le permanganate de potasse, ce qui permet en le détruisant de le séparer de l'acide succinique avec lequel il est habituellement entraîné et qui dans les mêmes conditions résiste à l'oxydation.

Ces explications données, cette façon de procéder conduit alors au problème général suivant.

*Analyse quantitative d'un mélange d'acide lactique, succinique et oxalique.*

PRINCIPES DE LA MÉTHODE. — I. — Lorsqu'on sature une solution alcoolique bouillante d'acides lactique, succinique et oxalique par de l'eau de baryte, le titre de la liqueur alcoolique demeurant au voisinage de 75°-80°, tout l'acide succinique précipite à l'état de succinate de baryum anhydre, tout l'acide oxalique à l'état d'oxalate de baryte de composition  $C^2O^4Ba + H^2O$ , le lactate de baryum restant en dissolution dans le milieu alcoolique.

II. — Dans un mélange d'acides succinique et oxalique ou de leurs sels, la séparation et l'estimation des deux acides peuvent être obtenues en se fondant sur le fait que l'acide succinique résiste bien aux agents oxydants, et qu'en



particulier le permanganate de potasse ne réagit pas sur lui dans les conditions où il détruit l'acide oxalique.

*Saturation barytique.* — Le résidu laissé par l'éther est repris par 40<sup>cc</sup> d'alcool à 95°; la solution introduite dans une fiole conique de Bohême est additionnée de deux gouttes de teinture de phthaléine du phénol et portée à l'ébullition au bain-marie; on y ajoute goutte à goutte une solution saturée d'hydrate de baryte jusqu'à neutralisation exacte; on maintient encore le mélange au bain-marie pendant dix minutes environ, à une température voisine de son point d'ébullition.

Le précipité rassemblé est recueilli sur un petit filtre et lavé avec de l'alcool à 90° bouillant, jusqu'à ce que le filtratum ne précipite plus par l'acide sulfurique.

#### Dosage de l'acide succinique.

Le précipité mixte de succinate et d'oxalate de baryte est détaché en totalité du filtre par entraînement à l'aide d'un jet de pissette et recueilli dans une capsule de platine tarée; après évaporation au bain-marie, le précipité a été desséché à 130° pendant dix minutes et pesé; dans ces conditions, l'oxalate de baryte retient une demi-molécule d'eau de cristallisation et a pour composition  $C^2O^1Ba, 1/2 H^2O$ .

Succinate de baryte + oxalate de baryte = 0<sup>gr</sup>.2431

*Evaluation de l'oxalate de baryte.* — Le précipité est remis en suspension dans l'eau; on y ajoute un excès d'acide sulfurique et, la température du mélange étant au voisinage de 50°, on estime l'acide oxalique à l'aide d'une solution de permanganate de potasse titrée à 2 grammes par litre: il faut employer 4<sup>cc</sup> de cette liqueur,

soit  $4 \times 0^{\text{gr}}.002 = 0^{\text{gr}}.008$  de permanganate  
ce qui correspond à  $2 \times 0^{\text{gr}}.008 = 0^{\text{gr}}.016$  d'acide oxalique cristallisé

ou à  $\frac{234}{126} \times 0^{\text{gr}}.016 = 0^{\text{gr}}.0296$  d'oxalate de baryte  
( $C^2O^1Ba, 1/2 H^2O$ ).

Calcul de l'acide succinique :

Succinate de baryte :  $0^{\text{gr}}.2431 - 0^{\text{gr}}.0296 = 0^{\text{gr}}.2135$

Acide succinique :  $0^{\text{gr}}.2135 \times 0.4664 = 0^{\text{gr}}.0995$

soit 0 gr. 995 d'acide succinique par litre de culture.

Acidité acétique équivalente :  $0^{\text{gr}}.995 \times 1.016 = 1^{\text{gr}}.011$

### Dosage de l'acide lactique.

La liqueur alcoolique est évaporée au bain-marie dans une capsule de platine tarée ; on obtient un résidu sirupeux jaunâtre incristallisable de lactate de baryum que l'on dessèche à l'éluve à 130° pendant trois heures et que l'on pèse.

Poids du lactate de baryte anhydre : 0gr. 2742

*Transformation du lactate de baryte en sulfate de baryte :*

|                              |           |           |
|------------------------------|-----------|-----------|
|                              | Trouvé    | Calculé   |
| Poids du sulfate de baryte : | 0gr. 2038 | 0gr. 2027 |

Calcul de l'acide lactique :

Au moyen du lactate de baryte : 0gr. 2742  $\times$  0.5714 = 0gr. 1566  
 — sulfate de baryte : 0gr. 2038  $\times$  0.7725 = 0gr. 1574

soit 1 gr. 56 d'acide lactique par litre de culture.

Acidité acétique équivalente : 1gr. 56  $\times$  0.644 = 1gr. 004

Acidité fixe, en acide acétique : 1gr. 011 + 1gr. 004 = 2gr. 015

ACIDITÉ TOTALE (volatile et fixe), en acide acétique, par litre du liquide de fermentation :

$$2\text{gr. } 031 + 2\text{gr. } 015 = 4\text{gr. } 046$$

D'après la quantité, 3 gr. 85, de carbonate de chaux dissoute par les acides engendrés, cette acidité totale serait équivalente à 4 gr. 62 d'acide acétique, nombre légèrement supérieur au précédent, dans l'évaluation duquel nous n'avons pas tenu compte de l'acidité carbonique qui contribue, elle aussi, pour une part très sensible, à la dissolution du carbonate de chaux.

### Recherche et dosage des alcools.

Le fractionnement de distillation mis à part au moment de l'extraction des acides volatils renferme de l'alcool éthylique dans la proportion moyenne de 1 gr. 58 par litre du liquide de fermentation. Mais si l'éthanol est le seul représentant de la fonction alcool réellement décelable et dosable dans les fractionnements de tête de ce liquide, cette fermentation de la glycérine donne encore naissance à de petites quantités d'un autre alcool, relativement fixe, son

point d'ébullition étant situé à  $214^{\circ}$ , et qui est le *propylglycol* normal ou *glycol triméthylénique*.

La présence de ce corps, restée inaperçue dans les opérations précédentes effectuées sans carbonate de chaux et par suite très incomplètes, nous a été révélée dans cette fermentation en milieu minéral additionné de carbonate de chaux, précisément en recherchant si, dans ces conditions de neutralisation constante du milieu, la transformation de la glycérine était totale. En utilisant les méthodes d'extraction usitées en pareil cas et précédemment rappelées, nous avons obtenu invariablement un résidu sirupeux à saveur chaude et légèrement sucrée, que nous avons pris tout d'abord et à plusieurs reprises pour de la glycérine non transformée, tant cette opinion paraissait vraisemblable et s'imposait à l'esprit. Mais, en poussant plus loin l'analyse, il nous a été facile de reconnaître que ce résidu ne contient pas trace de glycérine, si la fermentation a été suffisamment prolongée et en prenant soin de protéger le bacille contre l'acidité du milieu, en remettant en suspension le carbonate de chaux par l'agitation journalière du liquide : ce résidu, chauffé avec du bisulfate de potasse, ne donne en effet aucun dégagement d'acroléine.

Pour en faire l'étude qualitative et quantitative, en particulier pour essayer de retirer de ce résidu un fractionnement à point d'ébullition fixe, nous avons opéré comme dans la fermentation de la glycérine sous l'action d'un bacille retiré des eaux et qui conduit également à la production de ce glycol. En réalité, c'est au cours de l'étude de cette nouvelle action fermentaire, qui constitue la seconde partie de notre travail, que la présence du glycol triméthylénique a été d'abord soupçonnée et révélée ensuite, soit dans cette transformation particulière de la glycérine, soit dans celle qui nous occupe actuellement. Après avoir reconnu la très grande ressemblance de ces deux actions fermentaires dues, l'une à un bacille retiré de l'eau, l'autre à un bacille isolé d'un vin amer, il était naturel de prévoir que le glycol triméthylénique produit par l'une devait être aussi engendré par l'autre : il suffisait alors d'interroger l'expérience pour avoir une réponse, laquelle fût effectivement positive.

Désireux de conserver autant que possible, dans cette reproduction écrite de notre travail, l'ordre même de nos

recherches expérimentales, mais toutefois sans nuire à la clarté de son exposé, nous réserverons le compte rendu analytique de la formation du propylglycol à la seconde partie de notre étude : nous nous bornerons simplement ici à faire connaître le mode de dosage employé pour ce glycol et sa quantité moyenne produite dans la transformation de la glycérine par le *Bacillus amaracrylus*.

*Dosage du glycol triméthylénique.* — Après avoir reconnu, par l'examen qualitatif d'une partie du liquide fermenté, que la transformation de la glycérine était complète, nous avons appliqué les méthodes de dosage précédemment indiquées pour cette substance à l'évaluation du glycol triméthylénique; c'est-à-dire, soit la méthode classique par extraction à l'alcool-éther, soit le procédé à l'éther acétique : nous avons opéré chaque fois avec 300<sup>cc</sup> de liquide de fermentation.

A la suite de plusieurs expériences, nous avons reconnu que la quantité de propylglycol formé était sujette à de plus grandes variations que celles observées pour les autres produits de la fermentation; les nombres obtenus avec divers liquides et rapportés à un litre étant les suivants :

| Liquides fermentés    | Propylglycol |
|-----------------------|--------------|
| 1 <sup>er</sup> ..... | 0gr. 60      |
| 2 <sup>e</sup> .....  | 0gr. 90      |
| 3 <sup>e</sup> .....  | 1gr. 45      |

Cette variabilité doit correspondre à une inégale activité déshydratante du ferment, la formation du glycol paraissant suivre une marche inverse de celle de l'acroléine.

La moyenne de ces trois essais donne comme résultat environ un gramme de glycol propylénique normal par litre de liquide de fermentation, soit pour dix grammes de glycérine transformée.

#### Recherche, dosage et variations de l'acroléine.

Dans ce milieu maintenu constamment neutre par le carbonate de chaux, la production et les variations de l'acroléine offrent des observations analogues à celles déjà relevées au cours des fermentations antérieures, effectuées sans addition de craie.



Toutefois, si dans ces conditions de neutralité, la production de l'aldéhyde acrylique est plus régulière et se manifeste jusqu'à la fin de l'opération, à tel point que dans une culture glycéinée où la fermentation est arrêtée par l'action paralysante des acides engendrés, il suffit d'ajouter du carbonate de chaux pour voir la fermentation continuer et la réaction acroléinique se produire à nouveau ; il convient de remarquer aussi que dans un tel milieu essentiellement favorable à la vitalité du ferment, surtout lorsqu'il a été préalablement additionné de peptone, les métamorphoses de l'acroléine sont parallèlement facilitées et plus rapides, comme si elles n'étaient pas uniquement d'ordre chimique, mais dépendantes aussi et dans une certaine mesure de l'acte vital.

En sorte que, à un moment quelconque de l'opération, la proportion d'aldéhyde acrylique contenue dans le vase à fermentation et estimée colorimétriquement par le réactif *protéique acide* n'est pas supérieure à celles que le même réactif permet d'évaluer dans les transformations précédentes effectuées en l'absence de carbonate de chaux.

Enfin, dans ces conditions de saturation calcaire, on reconnaît également que la formation de l'acroléine est toujours précédée de celle d'un autre aldéhyde dont la production est encore plus nettement accusée que dans les opérations précédentes. Dans la grande majorité de nos essais, à un moment donné, nous avons pu observer en effet que le liquide fermenté recolorait énergiquement le bisulfite de rosaniline et qu'on pouvait en extraire un principe réduisant le nitrate d'argent ammoniacal, sans qu'il donnât par le réactif *protéique acide* la coloration vert bleuâtre spéciale à l'acroléine. Au début de la fermentation, en particulier, ce réactif des aldéhydes fournit simplement une coloration rose violacé analogue à celle que donne dans les mêmes circonstances le *propanolal 1.3* ou aldéhyde *hydracrylique*, produit transitoire de déshydratation entre la glycérine et l'aldéhyde acrylique.

Ainsi que nous en avons déjà convenu, nous reviendrons plus loin, dans une étude détaillée sur les faits qui militent en faveur de cette phase intermédiaire dans l'activité déshydratante du ferment et que nous signalons simplement dans ce compte rendu sommaire de l'une des principales actions qu'il exerce sur la glycérine.

# RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

| Glycérine transformée, pour cent..... |                       | 100.                    |                                          |
|---------------------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------------------------|
|                                       |                       | Par litre<br>de culture | Pour cent<br>de glycérine<br>transformée |
| Gaz {                                 | H.....                | 959 <sup>cc</sup>       | 9590 <sup>cc</sup>                       |
|                                       | CO <sup>2</sup> ..... | 609 <sup>cc</sup>       | 6090 <sup>cc</sup>                       |
| Acidité, en acide acétique {          | totale ...            | 4 <sup>gr</sup> 046     | 40 <sup>gr</sup> 46                      |
|                                       | volatile..            | 2 031                   | 20 31                                    |
|                                       | fixe .....            | 2 015                   | 20 15                                    |
| Acides volatils {                     | formique.....         | 0 690                   | 6 90                                     |
|                                       | acétique.....         | 0 944                   | 9 44                                     |
|                                       | acrylique.....        | 0 168                   | 1 68                                     |
|                                       | caprylique.....       | 0 115                   | 1 15                                     |
| Acides fixes {                        | lactique .....        | 1 560                   | 15 60                                    |
|                                       | succinique.....       | 0 995                   | 9 95                                     |
| Alcools {                             | éthylque.....         | 1 580                   | 15 80                                    |
|                                       | propylglycol.....     | 1 450                   | 14 50                                    |

Dans ce tableau, nous attribuons au propylglycol la quantité maxima fournie par nos analyses.

## RENDEMENT

|                                |   |                       |       |   |                     |
|--------------------------------|---|-----------------------|-------|---|---------------------|
| Gaz                            | { | H.....                | 0.85  | } | 12.85               |
|                                |   | CO <sup>2</sup> ..... | 12.   |   |                     |
| Acides volatils                | { | formique..            | 6.90  | } | 19.17               |
|                                |   | acétique..            | 9.44  |   |                     |
|                                |   | acrylique.            | 1.68  |   |                     |
|                                |   | caprylique            | 1.15  |   |                     |
| Acides fixes                   | { | lactique..            | 15.60 | } | 25.55               |
|                                |   | succinique            | 9.95  |   |                     |
| Alcools                        | { | éthylque.             | 15.80 | } | 30.30               |
|                                |   | propylglycol          | 14.50 |   |                     |
| Total des produits dosés ..... |   |                       |       |   | 87.87               |
|                                |   |                       |       |   | p. 100 de glycérine |

*Éléments non dosés.* — L'écart à cent est dû aux éléments non dosés dont une faible part doit revenir aux aldéhydes hydraérylique et acrylique ainsi qu'à leurs divers dérivés, notamment par polymérisation, résinification et acétalisation, ou peut-être même par hydrogénation en ce qui concerne l'acroléine.

Dans cette différence doit figurer aussi la proportion de glycérine qui contribue à la vie du ferment et à sa reproduction, c'est-à-dire l'ensemble des éléments de la substance fermentescible qui sont immobilisés pour former la matière et le corps des microbes. Enfin, un aussi long séjour à l'étuve doit occasionner une légère perte inévitable d'alcool entraîné par les gaz dégagés.

Mais cette différence est représentée surtout par l'eau éliminée de la glycérine ; à ce sujet, il est utile d'observer que par simple transformation en aldéhyde hydracrylique la glycérine perd déjà environ 20 pour cent de son poids d'eau, soit près de 40 pour cent lorsque sa déshydratation est complète et aboutit à l'acroléine.

Nous verrons également que la formation des acides caprylique et succinique peut libérer une petite quantité d'eau non dosée.

Inversement, nous aurons à envisager la transformation aqueuse de l'acroléine par une réaction exigeant la décomposition de l'eau, fournissant par conséquent au compte pondéral des produits obtenus de l'hydrogène et de l'oxygène non pesés au départ.

Dans l'appréciation de ce rendement, et si nous connaissons bien qualitativement tout le phénomène, les résultats quantitatifs précédents pouvant être considérés comme suffisamment exacts, la grandeur de la différence entre la proportion de glycérine entrant en réaction et celle des éléments dosés qui en dérivent, donne une mesure approchée de l'importance du procès de déshydratation. D'après l'analyse élémentaire précédente et en admettant que la déshydratation représente uniquement une réaction isolée, surajoutée, sa valeur correspondrait environ à 60 pour cent de la glycérine transformée, en supposant que le départ de l'eau s'arrête à l'aldéhyde hydracrylique, et à 30 pour cent s'il va totalement jusqu'à l'acroléine. Mais rien ne prouve jusqu'ici que cette modification par soustraction d'eau, la plus simple que l'on puisse considérer, celle qui se présente le plus souvent en chimie à l'origine de la simplification d'une molécule, ne constitue pas une première étape dans la marche analytique de ce procès de fermentation, phase initiale dont seraient tributaires au moins certains des produits précédemment

reconnus et dosés, en particulier le glycol triméthylénique et les acides volatils.

Comparaison et discussion des résultats de fermentation de la Glycérine  
en milieu acide et en milieu neutre.

En ce qui concerne les éléments dosés, la différence essentielle se rapporte à l'acidité totale et aux variations de chacune de ses parties.

Dans le milieu maintenu constamment neutre par addition de carbonate de chaux, le chiffre de l'acidité est plus élevé qu'en milieu acide ; nous retrouvons ainsi un fait d'ordre général dans l'histoire des fermentations, le rendement en acidité étant toujours plus grand en présence de craie qu'en son absence. Une telle augmentation se produit pour d'autres raisons dans d'autres réactions chimiques comportant la mise en liberté d'un acide ; nous connaissons en particulier l'influence favorable exercée par un alcali ou un corps à fonction alcaline dans le phénomène de la saponification d'un éther.

En matière de fermentation, la présence d'un agent de neutralisation a aussi pour résultat de rendre l'action plus rapide et plus complète, favorisée qu'elle est à la fois par le dégagement de chaleur dû à la saturation de l'acidité, lequel augmente d'autant le signe thermochimique de la réaction totale, et surtout par une moindre diminution de la vitalité et conséquemment de l'activité microbiennes qui ne se trouvent plus paralysées par les acides engendrés.

Mais la différence la plus saillante se trouve dans les variations inverses des acidités volatile et fixe. Plus élevée dans le milieu acide, l'acidité volatile diminue de un sixième de sa valeur dans le milieu neutre et cette diminution affecte presque uniquement l'acide acétique : parallèlement, l'acidité fixe suit une marche inverse et se trouve très notablement supérieure dans le milieu neutre, l'accroissement portant sur ses deux représentants, mais spécialement sur l'acide lactique.

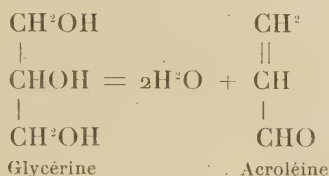
Enfin, à ne considérer que la fermentation en milieu minéral, la formation d'alcool éthylique est moindre en milieu neutre qu'en milieu acide.



Formules chimiques de la production des différents corps  
dans cette fermentation de la Glycérine.

En général, nous allons considérer chacun de ces corps comme naissant directement de la glycérine : ultérieurement nous verrons comment on peut concevoir la genèse indirecte de certains d'entre eux à partir de composés antérieurement formés aux dépens de cette substance.

a) *Formation de l'aldéhyde hydracrylique et de l'acroléine.* — La production de l'acroléine correspond à la formule classique :

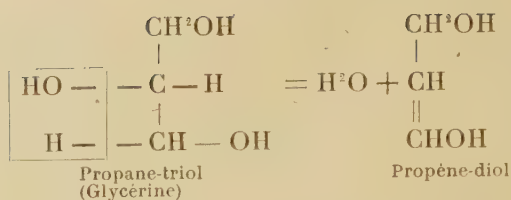


Dans cette fermentation, l'aldéhyde acrylique paraît dériver directement de la glycérine, au moins suivant son mode chimique usuel de formation par action des agents de déshydratation sur cet alcool, que nous reproduisons ci-dessous.

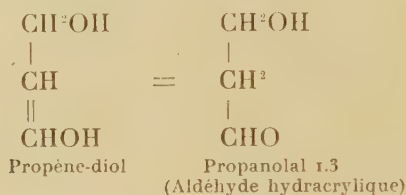
A part la production très vraisemblable d'aldéhyde hydracrylique que nous avons déjà plusieurs fois signalée et sur laquelle nous aurons à revenir dans une étude plus détaillée, qui contribuera à accroître notre conviction sur son existence constante, parfois même prépondérante dans le vase à fermentation, dans aucun cas de nos nombreux essais, nous n'avons réussi à isoler des cultures un corps stable, nettement défini, qui pût servir de substance intermédiaire. De plus, les produits habituels de fermentation de la glycérine, en particulier les acides : butyrique, lactique, succinique; le glycérose, la dioxyacétone; le glycol triméthylénique, ne donnent pas d'acroléine lorsqu'on les introduit dans les cultures.

Quand la glycérine est soumise à l'action des agents chimiques de déshydratation, on admet que ceux-ci agissent sur elle en deux phases différentes.

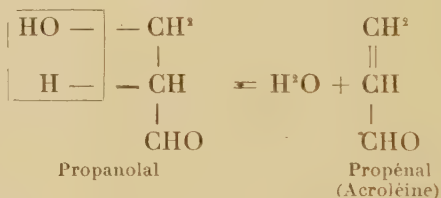
Dans une première phase, ce tri-alcool se comporte comme un glycol, et il se produit aux dépens de deux de ses fonctions alcooliques, primaire et secondaire, une déshydratation qui donne un alcool éthylénique.



Cet alcool éthylnique est instable et se transforme par migration de l'atome d'hydrogène alcoolique secondaire en un corps isomère à fonction aldéhydique saturée :



Dans une seconde phase, l'agent de déshydratation poursuit son action suivant la manière ordinaire en soustrayant sous forme d'une deuxième molécule d'eau la fonction alcoolique et l'atome d'hydrogène voisin, en donnant un aldéhyde non saturé à fonction éthylnique :



Bien que n'ayant pu isoler ce corps intermédiaire de déshydratation simple, le propanolal, ou même le caractériser aussi nettement que nous avons pu le faire pour l'acroléine, nous verrons que sa formation est motivée pour des raisons diverses dont nous donnerons ultérieurement le détail, raisons basées non plus seulement sur l'hypothèse, mais aussi raisons expérimentales.

b) *Production des acides volatils.* — Les trois acides, formique, acétique et acrylique doivent être engendrés, au moins en partie, par l'action décomposante de l'eau sur l'acroléine (1); alors, leur formation s'accompagne d'un dégagement d'hydrogène : l'acide acrylique pouvant aussi résulter de l'oxydation de l'acroléine ; dans cette hypo-

(1) J. REDTENBACHER. Ueber die zerlegungsprodukte des Glyceryloxydes durch trockene Destillation. — *Annalen der Chemie und Pharmacie*, t. 47, p. 113-143-148 ; 1843.

GERHARDT. — *Chimie organique*, t. 1, p. 780.

thèse, il faudrait admettre une véritable combustion intérieure par l'oxygène de l'eau, réaction qui fournirait encore de l'hydrogène.

En ce qui concerne les acides formique et acétique, on peut aussi les concevoir comme nés directement de la glycérine par des formules de fermentation très simples.

ACIDE FORMIQUE. — Cet acide dérive de la glycérine par la réaction de dédoublement suivante qui explique en même temps la formation d'alcool éthylique, et commentée plus loin :



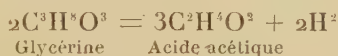
L'acide formique peut être aussi considéré comme engendré dans une combustion incomplète de la glycérine aux dépens de l'oxygène de l'eau, suivant la formule :



Chacun de ces modes de formation pouvant d'ailleurs être accompagné d'une destruction partielle de l'acide formique primitivement formé, suivant l'équation :

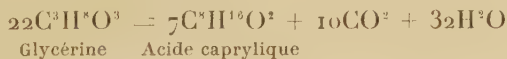


ACIDE ACÉTIQUE. — La production directe de l'acide acétique aux dépens de la glycérine est exprimée par la formulé :



qui traduit simplement une déshydrogénation de la substance fermentescible.

ACIDE CAPRYLIQUE. — En admettant que cet acide soit le représentant principal de l'acidité volatile insoluble; ce qui résulte des considérations expérimentales précédemment rapportées, chacune des deux réactions suivantes rend compte de sa formation, l'une avec un dégagement d'acide carbonique seul, l'autre avec un dégagement mixte de ce gaz et d'hydrogène :

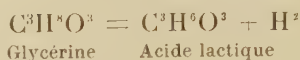


la première libérant en même temps une certaine quantité d'eau dont il faudrait tenir compte dans le bilan final.

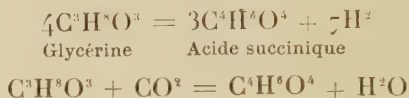
c) *Production des acides fixes.* — ACIDE LACTIQUE. — La formation de l'acide lactique aux dépens de la glycérine ne comporte aucune adjonction d'eau, ni aucun dégagement d'acide carbonique, mais seulement une libération d'hydrogène.

La formule de transformation anaérobie de la glycérine en acide

lactique ne peut en effet être que la suivante, simple réaction de déshydrogénation :



ACIDE SUCCINIQUE. — Relativement à la production de l'acide succinique à partir de la glycérine, on trouve les deux formules de construction suivantes :



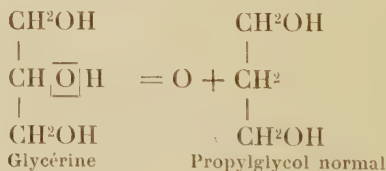
chacune de ces réactions étant synthétique : l'une libérant de l'hydrogène, l'autre fixant de l'anhydride carbonique.

d) *Production de l'alcool éthylique.* — De même que la mannite, alcool hexatomique, est l'alcool d'un sucre hexose, le glucose; la glycérine, alcool triatomique, est aussi l'alcool d'un sucre triose, le glycérose, dont elle ne diffère que par deux atomes d'hydrogène en plus : la production d'alcool aux dépens de la glycérine ne peut donc se faire que suivant la formule très simple :



Il est à remarquer que dans cette équation les gaz carbonique et hydrogène sont formés dans les mêmes proportions que celles qui constituent l'acide formique  $\text{CO}^2\text{H}^2$ . Comme nous trouvons cet acide parmi les produits du bacille, s'il est vrai qu'il prend naissance dans la métamorphose aqueuse de l'acroléine, on peut aussi le considérer comme engendré, au moins en partie, par cette fermentation alcoolique de la glycérine, suivant la réaction formulée plus haut, et qui correspond à un dédoublement de la glycérine en alcool et acide formique : les deux formules sont aussi possibles l'une que l'autre, bien que la seconde corresponde à un dégagement de chaleur légèrement supérieur à celui de la première qui est faible ou nul.

e) *Production du glycol triméthylénique.* — Le schéma le plus simple qui fait dériver le glycol propylénique normal de la glycérine est le suivant :

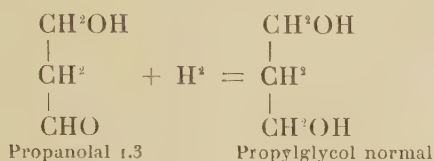


En admettant la possibilité de cette réaction, par quel moyen s'effectuerait la soustraction de l'oxygène, si ce n'est l'emprunt par le microbe lui-même de cet élément à la glycérine, soit comme aliment respiratoire, soit pour produire des combustions nouvelles ; le départ



de l'oxygène de ce tri-alcool par réduction sous l'influence de l'hydrogène naissant n'étant pas prévu par nos connaissances sur les réactions chimiques des alcools ?

Mais la formation du glycol triméthylénique à partir de la glycérine trouve une explication beaucoup plus plausible dans l'hydrogénation du propanolal, qui est précisément l'aldéhyde correspondant à ce glycol. Cette fermentation de la glycérine étant accompagnée d'une abondante production d'hydrogène résultant de sa transformation analytique, notamment en acides acétique et lactique, ou peut-être même de sa transformation synthétique sous forme d'acide succinique, cette hypothèse fondée sur la génération classique d'un alcool par hydrogénation de son aldéhyde, conformément à la formule :



est très vraisemblable.

Examinons si la mesure du dégagement gazeux d'hydrogène justifie cette manière de voir. En ne considérant que la production de ce gaz corrélative de celle des acides acétique, lactique et succinique, si on calcule d'après les équations de formation ci-dessus écrites, le volume d'hydrogène correspondant à la quantité précédemment évaluée de chacun de ces acides, et si on totalise les résultats obtenus, on trouve que le volume de ce gaz ainsi calculé est déjà supérieur au volume réellement dégagé et mesuré. Mais ces sources d'hydrogène ne sont pas les seules, et, à part celles qui peuvent se rattacher à la formation des acides formique et caprylique, le simple examen de nos formules montre que la production de ce gaz est encore dépendante de celle de l'acide carbonique. Il n'est pas possible, en effet, d'équilibrer la comptabilité de ce dernier gaz si l'on n'admet que la naissance de sa majeure partie est concomitante de celle de l'alcool éthylique, suivant l'une des formules que nous avons données pour la production de ce corps, ou le résultat d'une dissociation de l'acide formique effectuée par le ferment; toutes réactions qui libèrent en même temps un volume notable d'hydrogène, égal à celui de l'acide carbonique.

## ESSAI D'UNE SYNTHÈSE DE L'ACTION TOTALE

En général, si complexe que soit l'action d'un microbe, c'est-à-dire si variés que soient les produits auxquels il donne naissance, on peut, en envisageant chacun de ces corps comme résultant d'une action spéciale pouvant être considérée, hypothétiquement, il est vrai, mais avantageusement au point de vue de l'intelligence synthétique du phénomène, comme diastasique, écrire en partant d'équations générales l'équation particulière de formation de ce corps et calculer la quantité de substance fermentescible qui lui a donné naissance. L'équation générale de la fermentation s'obtient alors en écrivant les unes au-dessous des autres ces équations particulières, chacune dans la proportion pour laquelle elle entre dans le résultat total et en en faisant la somme.

Inversement, étant donnée une fermentation dont on connaît qualitativement et quantitativement tous les produits, en même temps que la quantité totale de matière disparue, on peut établir une équation empirique qui représentera la superposition des équations correspondantes à la formation de chacun des produits. Cette équation, si elle est exacte, pourra dès lors être en quelque sorte démembrée, en en faisant sortir successivement les équations particulières dont elle se compose.

Malgré les résultats analytiques qualitatifs et quantitatifs relativement nombreux que nous avons obtenus, chacune de ces méthodes générales, par analyse ou par synthèse, n'a pu nous conduire à un schéma de l'action totale, et cette impossibilité tient à la complication des actions principales par un nombre trop grand d'actions secondaires.

En premier lieu, les multiples métamorphoses de l'acroléine résultant de sa transformation en solution aqueuse, de sa polymérisation, de sa résinification, de son acétalisation, et vraisemblablement aussi de son hydrogénation, ne permettent pas d'estimer, même approximativement, la quantité de glycérine qui fait les frais de la réaction primitive de déshydratation.

Les aldéhydes se forment fréquemment dans les procès de fermentation, mais en général elles apparaissent en petite quantité, comme des produits secondaires, et non comme des substances fondamentales, primordiales, directement dérivées d'un corps fermentescible : cependant, il y a des exceptions à cette règle et l'étude actuelle en offre un remarquable exemple, l'acroléine paraissant provenir de la

glycérine par le simple intermédiaire d'un autre aldéhyde, le propional. Dans ce cas de dérivation directe qui leur fait jouer un rôle important, peut-être même prépondérant, on comprend, en raison de leurs affinités chimiques puissantes, que les aldéhydes compliquent singulièrement le phénomène de la fermentation, particulièrement lorsqu'il s'agit d'un représentant de cette classe de corps aussi altérable que l'aldéhyde acrylique : c'est ainsi que si l'on peut bien doser l'acroléine existant à un moment donné dans le vase à fermentation, il n'est pas possible de connaître la quantité de cet aldéhyde engendré depuis le début jusqu'à ce moment de l'opération.

Une autre incertitude règne dans le dosage de l'hydrogène : nous avons bien obtenu la quantité de ce gaz rendu libre, mais nous ne pouvons prétendre à connaître la proportion totale qui a pu être retenue par fixation sur d'autres corps, comme l'aldéhyde hydracrylique, l'acroléine, peut-être même l'acide acrylique.

Il convient de remarquer que, à part l'hydrogénation de l'aldéhyde hydracrylique pour former le glycol triméthylénique qui figure en quantité assez importante parmi les produits engendrés, le volume des autres fractions ainsi fixées ne peut être que très réduit : mais néanmoins, ne serait-il que de quelques centimètres cubes, il faudrait encore pouvoir en tenir compte dans le bilan final. En ce qui concerne le quantum d'hydrogène dégagé et mesuré, il n'est pas davantage possible de faire la part pouvant revenir à trois de ses nombreuses origines que nous avons considérées, et correspondant à la formation d'acide acrylique, soit par transformation aqueuse de l'acroléine, soit par oxydation simple de cet aldéhyde au moyen de l'oxygène libéré de l'eau, ainsi qu'à la décomposition de l'acide formique.

Voyons si l'acide carbonique dont les origines et les destinations sont moins variées peut nous donner des indications utiles. Les réactions précédentes lui assignent comme origines la formation de l'acide caprylique, de l'alcool éthylique, et la dissociation fermentaire de l'acide formique ; il convient naturellement d'y ajouter la minime quantité résultant de l'acte respiratoire du ferment : enfin, en regard de cette production analytique, nous devons aussi rappeler la réaction synthétique que nous avons indiquée comme susceptible d'utiliser ce gaz en le fixant sur la glycérine pour donner de l'acide succinique. Dans la formation de l'acide caprylique, l'acide carbonique peut être libéré de la glycérine par deux réactions, l'une dégageant ce gaz à l'état pur, l'autre le donnant mélangé avec de l'hydrogène ; tandis que ces deux gaz sont toujours associés à volumes égaux dans la production de l'alcool éthylique ou dans la destruction de l'acide formique. La quantité d'acide carbonique calculée par rapport à l'acide caprylique étant très insuffisante, même en faisant choix pour cette évaluation de la deuxième formule de production de cet acide précédemment inscrite, nous devons rapporter le volume notable de ce gaz dégagé à ses autres origines. En ne considérant que la fermentation alcoolique, la proportion d'acide carbonique calculée par rapport à l'alcool produit est déjà plus que suffisante pour servir de complément, vis-à-vis du volume de ce gaz dégagé, à celle résultant de la formation de l'acide caprylique ; mais ce résultat arithmétique serait également

vérifié en admettant une production temporaire d'acide formique suivie de la dissociation ultérieure de ce composé dont l'excès seul resterait dans la liqueur. En sorte que dans cette comptabilité de l'acide carbonique, il n'est pas possible de faire la part revenant à l'une ou à l'autre de ces deux origines : d'autre part, nous ignorons si une certaine quantité de ce gaz ne contribue pas à la synthèse de l'acide succinique.

Bref, en présence d'un ensemble aussi complexe de divers phénomènes, dont certains peuvent être traduits par des réactions différentes, au lieu de chercher à représenter par une formule générale cette transformation de la glycérine, il vaut mieux considérer l'action totale comme une superposition d'actions aboutissant individuellement à chacun des corps dont l'existence temporaire ou permanente dans le vase à fermentation nous a été révélée.

C'est également à cette conclusion que nous nous rallions dans l'interprétation des résultats de chacune des études qui vont suivre, relatives aux transformations exercées par le ferment sur diverses substances fermentescibles.

---



## Fermentation de la Mannite

---

Cet alcool hexatomique est facilement et rapidement transformé par le *Bacillus amaracrylus*, avec production d'un abondant dégagement de gaz hydrogène et carbonique. Les autres produits reconnus par l'analyse sont les mêmes que ceux de la fermentation de la glycérine, à part les deux aldéhydes résultant de sa déshydratation et leurs dérivés ; c'est-à-dire que nous allons retrouver dans cet exemple : l'alcool éthylique ; les acides, formique, acétique, un acide volatil insoluble, et les acides lactique et succinique.

Comme pour la glycérine, nous avons effectué cette fermentation, en milieu peptoné ou en milieu minéral, sans carbonate de chaux, et en milieu minéral avec addition de cet agent de neutralisation. Nous ne reproduisons ici que les résultats de la transformation en milieu minéral, en raison des avantages que présente un tel milieu pour l'étude analytique des produits formés, avantages déjà mentionnés à propos de la fermentation de la glycérine.

### Fermentation de la Mannite

EN MILIEU MINÉRAL SANS CARBONATE DE CHAUX

Le milieu minéral de composition suivante :

|                               |           |
|-------------------------------|-----------|
| Sulfate d'ammoniaque .....    | 4 gr. 50  |
| Phosphate monopotassique..... | 0 gr. 75  |
| Sulfate de magnésie .....     | 0 gr. 10  |
| Mannite .....                 | 10 gr.    |
| Eau.. .....                   | Un litre. |

a été stérilisé, puis abandonné au refroidissement et ensemencé avec l'espèce pure : l'essai a été soumis aux conditions expérimentales précédemment exposées pour la glycérine. Le liquide de culture primitivement limpide devient rapidement trouble et progressivement acide, en même

temps qu'il est le siège d'un dégagement gazeux modéré se continuant pendant une semaine environ.

Comme pour la glycérine, et en raison de l'influence paralysante des acides formés, la transformation s'arrête bientôt : aussi, dans cette fermentation partielle, nous nous sommes borné à mesurer la proportion de mannite consommée, les gaz dégagés et l'acidité totale née dans le liquide, nous réservant d'étudier complètement l'action en milieu minéral maintenu dans un état de neutralité constante par la présence de craie.

#### ANALYSE DES GAZ

*Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures et gaz dissous, par litre de culture :*

|                                     | Volume            | CO <sup>2</sup>   | H                 |
|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 <sup>er</sup> fractionnement..... | 122 <sup>cc</sup> | 18 <sup>cc</sup>  | 104 <sup>cc</sup> |
| 2 <sup>e</sup> — .....              | 170               | 30                | 140               |
| 3 <sup>e</sup> — .....              | 150               | 28                | 122               |
| 4 <sup>e</sup> — .....              | 68                | 15                | 53                |
| 5 <sup>e</sup> — (durée : 2 jours). | 18                | 4                 | 14                |
| Total des gaz dégagés.....          | 528 <sup>cc</sup> | 95 <sup>cc</sup>  | 433 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous.....                    | 204 <sup>cc</sup> | 190 <sup>cc</sup> | 14 <sup>cc</sup>  |
| Gaz engendrés, par litre de culture | 732 <sup>cc</sup> | 285 <sup>cc</sup> | 447 <sup>cc</sup> |

#### ANALYSE DU LIQUIDE

*Proportion de mannite consommée : 24 pour 100.*

Nous l'avons estimée en utilisant le procédé de MM. Gayon et Dubourg (1), et en opérant par comparaison avec le liquide primitif non fermenté : cette évaluation sur ce liquide témoin est notamment indispensable quand il s'agit de doser la mannite dans une culture en milieu peptoné : la peptone n'étant pas complètement insoluble dans l'alcool concentré employé pour l'extraction de la mannite.

**ACIDITÉ TOTALE.** — Elle équivaut à 1 gr. 06 d'acide acétique par litre de culture.

Au cours de cette fermentation, nous avons constaté en outre que le liquide ne réduit pas la liqueur cupro-potassique.

(1) GAYON et DUBOURG. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1894.

## RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

|                                        |                       |                         |    |                                        |
|----------------------------------------|-----------------------|-------------------------|----|----------------------------------------|
| Mannite transformée, pour cent.....    |                       |                         | 24 |                                        |
|                                        |                       | Par litre<br>de culture |    | Pour cent<br>de mannite<br>transformée |
| Gaz {                                  | H.....                | 417 <sup>cc</sup>       |    | 18550 <sup>cc</sup>                    |
|                                        | CO <sup>2</sup> ..... | 285 <sup>cc</sup>       |    | 11827 <sup>cc</sup>                    |
| Acidité totale, en acide acétique..... |                       | 18 <sup>r</sup> .06     |    | 438 <sup>r</sup> .99                   |

## Fermentation de la Mannite

EN MILIEU MINÉRAL EN PRÉSENCE DE CARBONATE DE CHAUX

Le milieu liquide minéral précédent, contenant par litre 10 gr. de mannite pure, est réparti dans des flacons de un litre au fond desquels on a préalablement introduit dix grammes de carbonate de chaux pur ; on stérilise à 120°. Après refroidissement, le liquide est abandonné à lui-même pendant environ vingt-quatre heures, pour permettre son aération nouvelle, que l'on facilite d'ailleurs par agitation. Il est ensuite ensemencé, puis les flacons sont remplis entièrement et fermés par un bon bouchon muni d'un tube abducteur se rendant sur la cuve à mercure ; bouchons et tubes eux-mêmes stérilisés : le tout est placé à l'étuve à 30° et un mois après l'ensemencement, nous avons procédé à la détermination des résultats de la fermentation.

## ANALYSE DES GAZ

Au bout de deux jours, le dégagement gazeux se manifeste et devient rapide : les volumes mesurés suivants représentent les quantités de gaz recueillis par périodes de vingt-quatre heures et les gaz dissous, par litre de culture.

*Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures, et gaz dissous, par litre de culture :*

|                                         | Volume             | CO <sup>2</sup>    | H                  |
|-----------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 <sup>er</sup> fractionnement.....     | 515 <sup>cc</sup>  | 245 <sup>cc</sup>  | 270 <sup>cc</sup>  |
| 2 <sup>e</sup> — .....                  | 560                | 263                | 297                |
| 3 <sup>e</sup> — .....                  | 696                | 346                | 350                |
| 4 <sup>e</sup> — .....                  | 682                | 340                | 342                |
| 5 <sup>e</sup> — .....                  | 540                | 270                | 270                |
| 6 <sup>e</sup> — .....                  | 530                | 265                | 265                |
| 7 <sup>e</sup> — .....                  | 192                | 105                | 87                 |
| 8 <sup>e</sup> — (durée : 3 jours)..... | 48                 | 30                 | 18                 |
| Total des gaz dégagés.....              | 3763 <sup>cc</sup> | 1864 <sup>cc</sup> | 1899 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous.....                        | 310 <sup>cc</sup>  | 297 <sup>cc</sup>  | 13 <sup>cc</sup>   |
| Gaz engendrés, par litre de culture     | 4073 <sup>cc</sup> | 2161 <sup>cc</sup> | 1912 <sup>cc</sup> |

*Acide carbonique provenant du carbonate de chaux.* — Le dosage du carbonate de chaux résiduel permet d'estimer à 4 gr. 47 la quantité dissoute : en retranchant de ce nombre la fraction de 0 gr. 27, représentant la proportion de cette substance transformée par l'acidité phosphorique du milieu de culture, il en résulte une quantité de 4 gr. 20 décomposée par les acides engendrés, à laquelle correspond un volume de 934<sup>cc</sup> de gaz carbonique, qui doit être déduit du volume total de ce gaz.

En définitive, on obtient les résultats suivants pour le dégagement gazeux dans cette fermentation de la mannite :

$$\text{CO}^2 = 1227^{\text{cc}}$$

$$\text{H} = 1912^{\text{cc}}$$

#### ANALYSE DU LIQUIDE

Il présente une légère odeur, rappelant celle de l'acide caprylique ; une saveur fade de liquide fermenté, sans amertume : sa réaction est neutre à l'orangé et il colore le tournesol en rouge vineux.

*Proportion de mannite consommée :* 98.5 pour 100.

#### Séparation des acides volatils et des acides fixes.

Le liquide de fermentation provenant de un litre de culture a été isolé par décantation à l'aide d'un siphon et filtration du dépôt de carbonate de chaux résiduel et de phosphate de chaux formé par double décomposition. Ce dépôt est épuisé par l'eau bouillante et les eaux de lavage sont réunies au liquide primitif. Le mélange est additionné de six grammes d'acide oxalique cristallisé, quantité suffisante, non seulement pour précipiter la chaux contenue en dissolution dans la liqueur, mais encore pour libérer la totalité des acides formés dont une partie est engagée en combinaison alcaline avec la potasse, par suite de réactions entre les sels calciques de ces acides et le phosphate neutre de potasse né dans le milieu de culture ; tous faits déjà exposés précédemment : on vérifie d'ailleurs que l'acide oxalique est en quantité suffisante, puis on procède à l'extraction des acides volatils comme pour la fermentation de la glycérine.

#### ACIDITÉ VOLATILE

Le distillatum obtenu dans cette séparation des acides volatils est encore trouble, surtout au début de l'opération,



et à température basse on observe également la formation d'un léger enduit concrété, à réaction acide, dans la portion inférieure du réfrigérant et sur la paroi du col du ballon de condensation où se fait l'écoulement du liquide distillé : parfois aussi, on observe des gouttelettes huileuses à la surface de ce liquide.

L'étude de ce distillatum conduite d'après la méthode précédemment indiquée pour la glycérine, permet d'y reconnaître les acides *formique* et *acétique*, ainsi que l'existence en très petite quantité d'au moins un acide insoluble ou peu soluble dans l'eau, présentant les caractères déjà observés et signalés ; acidité insoluble vraisemblablement due en majeure partie à de l'acide *caprylique*. Il contient aussi de l'alcool éthylique.

#### Acidité volatile insoluble.

En recueillant sur un petit filtre mouillé le liquide de distillation au fur et à mesure de son écoulement, on sépare ainsi la majeure partie de l'acidité volatile insoluble : le filtre est ensuite immergé dans l'alcool chaud bien neutre et la liqueur est titrée à l'eau de chaux en présence de phthaléine.

Résultat : 0 gr. 056, en acide acétique, par litre de culture ; soit

$$0 \text{ gr. } 056 \times 2.4 = 0 \text{ gr. } 134$$

en acide caprylique, forme sous laquelle nous continuons à représenter cette acidité

#### Acidité volatile soluble.

Elle est représentée par les acides formique, acétique, et par une trace d'acide supérieur très peu soluble dans l'eau.

*Acidité volatile soluble totale.* — L'acidité de ce mélange provenant de un litre de culture équivaut à 1 gr. 38 d'acide acétique.

ACIDE FORMIQUE. — 0 gr. 53, par litre de culture.

ACIDE ACÉTIQUE. — Comme dans la fermentation de la glycérine, il a été évalué après élimination de l'acide formique, et par deux méthodes différentes.

a) *Par titrage acidimétrique.* — 0 gr. 726 par litre de culture.

b) *Dosage par la méthode de Duclaux.*

| Fractionnements<br>successifs de 10cc. | Eau de chaux       | Fractionnements<br>totalisés | Eau de chaux       |
|----------------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|
| 1 <sup>er</sup> .                      | 16 <sup>cc</sup> 4 | 10 premiers cmc.             | 16 <sup>cc</sup> 4 |
| 2 <sup>e</sup>                         | 17. 4              | 20 —                         | 33. 8              |
| 3 <sup>e</sup>                         | 17. 6              | 30 —                         | 51. 4              |
| 4 <sup>e</sup>                         | 18. 0              | 40 —                         | 69. 4              |
| 5 <sup>e</sup>                         | 18. 8              | 50 —                         | 88. 2              |
| 6 <sup>e</sup>                         | 19. 9              | 60 —                         | 108. 1             |
| 7 <sup>e</sup>                         | 20. 9              | 70 —                         | 129. 0             |
| 8 <sup>e</sup>                         | 22. 6              | 80 —                         | 151. 6             |
| 9 <sup>e</sup>                         | 24. 5              | 90 —                         | 176. 1             |
| 10 <sup>e</sup>                        | 28. 5              | 100 —                        | 204. 6             |

En consultant le tableau de ces nombres, on reconnaît encore cette irrégularité déjà observée dans l'accroissement des quantités d'eau de chaux saturantes : accroissement qui passe par un minimum entre le deuxième et le troisième terme ; irrégularité qui révèle la présence de traces d'un acide supérieur.

L'eau de chaux employée étant telle que un centimètre cube sature 0 gr. 0028 d'acide acétique, cette équivalence permet d'évaluer la quantité de cet acide contenue dans les cent premiers centimètres cubes par l'égalité :

$$204.6 \times 0^{\text{gr}}.0028 = 0^{\text{gr}}.572$$

Soit pour la totalité de l'acide acétique du liquide soumis à la distillation et provenant de un litre de culture :

$$\frac{0^{\text{gr}}.572 \times 100}{80} = 0^{\text{gr}}.714$$

Moyenne des deux résultats : 0 gr. 720 d'acide acétique, par litre de culture.

*Acidité volatile soluble* totale, en acide acétique :

|                                      |                                                     |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Acidité formique, en acide acétique, | $0^{\text{gr}}.53 \times 1.304 = 0^{\text{gr}}.691$ |
| — acétique, —                        | $0^{\text{gr}}.720$                                 |
| Trouvé : 1 <sup>gr</sup> .38         | Calculé : 1 <sup>gr</sup> .411                      |

*Acidité volatile* totale (soluble et insoluble), en acide acétique, par litre de culture :

$$1^{\text{gr}}.38 + 0^{\text{gr}}.056 = 1^{\text{gr}}.436$$

# ACIDITÉ FIXE

L'analyse qualitative de la liqueur qui reste après la séparation des acides volatils révèle la présence des acides *lactique* et *succinique* ; elle contient en outre un très minime excès d'acide oxalique ajouté pour la libération des acides de leurs combinaisons calciques ou salines en général. L'acide lactique formé est constitué par un mélange de ses représentants, inactif et gauche.

L'analyse quantitative a été exécutée avec le dixième de cette liqueur résiduelle et suivant la même technique opératoire que pour la fermentation de la glycérine.

## Dosage de l'acide succinique.

Poids du succinate et de l'oxalate de baryte : 0gr.4178

*Evaluation de l'oxalate de baryte.* — Il faut employer 5cc2 de solution de permanganate de potasse titrée à 2 grammes par litre.

soit  $5.2 \times 0gr.002 = 0gr.0104$  de permanganate

ce qui correspond à  $2 \times 0gr.0104 = 0gr.0208$  d'acide oxalique cristallisé

ou à  $\frac{234}{126} \times 0gr.0208 = 0gr.0386$  d'oxalate de baryte  
(C<sup>2</sup>O<sup>4</sup>Ba, 1/2 H<sup>2</sup>O).

Calcul de l'acide succinique :

Succinate de baryte : 0gr.4178 — 0gr.0386 = 0gr.3792

Acide succinique : 0gr.3792  $\times$  0.4664 = 0gr.1767

soit 1 gr. 767 d'acide succinique par litre de culture.

Acidité acétique équivalente : 1gr.767  $\times$  1.016 = 1gr.795

## Dosage de l'acide lactique.

Poids du lactate de baryte anhydre : 0gr.340

*Transformation du lactate de baryte en sulfate de baryte :*

|                              | Trouvé   | Calculé  |
|------------------------------|----------|----------|
| Poids du sulfate de baryte : | 0gr.2620 | 0gr.2514 |

Calcul de l'acide lactique :

Au moyen du lactate de baryte : 0gr.340  $\times$  0.5714 = 0gr.1942

Au moyen du sulfate de baryte : 0gr.262  $\times$  0.7725 = 0gr.2024

Soit, en moyenne, une quantité de 1 gr. 983 d'acide lactique par litre du liquide de fermentation.

Acidité acétique équivalente : 1gr.983  $\times$  0.644 = 1gr.277

Acidité *fixe*, en acide acétique :  $1^{\text{gr}}.795 + 1^{\text{gr}}.277 = 3^{\text{gr}}.072$

ACIDITÉ TOTALE (volatile et fixe), en acide acétique, par litre du liquide de fermentation :

$$1^{\text{gr}}.436 + 3^{\text{gr}}.072 = 4^{\text{gr}}.508$$

D'après la quantité, 4 gr. 20, de carbonate de chaux dissoute par les acides engendrés, l'acidité totale serait équivalente à 5 gr. 04 d'acide acétique, nombre sensiblement supérieur au précédent, dans l'évaluation duquel nous n'avons pas tenu compte de l'acidité carbonique qui contribue aussi, pour une part importante, à dissoudre du carbonate de chaux.

### Recherche et dosage des alcools.

L'étude du fractionnement de distillation mis à part au moment de la séparation des acides volatils, en vue de la recherche des alcools, montre qu'il contient de l'alcool *éthyl-lique*.

Cette recherche a été faite en utilisant les méthodes exposées dans l'étude de la fermentation de la glycérine, et la proportion d'alcool éthyl-lique fournie par plusieurs fermentations de la mannite a été, en moyenne, de 1 gr. 90 par litre du liquide de culture.

### RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

|                                        |                         |                                        |
|----------------------------------------|-------------------------|----------------------------------------|
| Mannite transformée, pour cent. ....   | 98.5                    |                                        |
|                                        | Par litre<br>de culture | Pour cent<br>de mannite<br>transformée |
| Gaz { H .....                          | 1912 <sup>cc</sup>      | 19406 <sup>cc</sup>                    |
| CO <sup>2</sup> .....                  | 1227 <sup>cc</sup>      | 12454 <sup>cc</sup>                    |
| Acidité, en acide acétique { totale... | 4 <sup>gr</sup> .508    | 45 <sup>gr</sup> .75                   |
| { volatile..                           | 1 436                   | 14 57                                  |
| { fixe .....                           | 3 072                   | 31 18                                  |
| Acides volatils { formique.....        | 0 53                    | 5 38                                   |
| { acétique.....                        | 0 72                    | 7 31                                   |
| { caprylique .....                     | 0 134                   | 1 36                                   |
| Acides fixes... { lactique... ..       | 1 983                   | 20 13                                  |
| { succinique .....                     | 1 767                   | 17 93                                  |
| Alcool éthyl-lique .....               | 1 90                    | 19 30                                  |



RENDEMENT

|                                |   |                       |       |   |                         |
|--------------------------------|---|-----------------------|-------|---|-------------------------|
| Gaz                            | { | H.....                | 1.73  | } | 26.26                   |
|                                | { | CO <sup>2</sup> ..... | 24.53 | } |                         |
| Acides volatils                | { | formique..            | 5.38  | } | 14.05                   |
|                                | { | acétique ..           | 7.31  | } |                         |
|                                | { | caprylique            | 1.36  | } |                         |
| Acides fixes ..                | { | lactique...           | 20.13 | } | 38.06                   |
|                                | { | succinique            | 17.93 | } |                         |
| Alcool éthylique .....         |   |                       | 19.30 |   | 19.30                   |
| Total des produits dosés ..... |   |                       |       |   | 97.67 p. 100 de mannite |

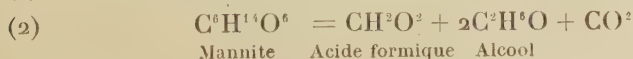
*Eléments non dosés.* — L'écart à 100 est dû aux éléments non dosés, parmi lesquels doivent figurer les constituants de la mannite qui sont immobilisés pour former la matière et le corps des microbes.

Dans l'appréciation de ce rendement, il est utile de remarquer, dès à présent, que pour établir le bilan de la fermentation, nous n'aurons besoin de recourir qu'à une seule réaction exigeant la décomposition de l'eau, laquelle fournit au compte pondéral des produits obtenus seulement une minime quantité d'hydrogène et d'oxygène non pesés au départ.

Enfin, et comme terme de correction de signe contraire à celui qui résulte de cette utilisation des éléments de l'eau, nous devons aussi signaler la petite quantité d'eau qui peut être libérée de la mannite dans la formation des acides caprylique et succinique, conformément à l'une des formules de génération de ces acides aux dépens de cet alcool hexatomique et ci-dessous transcrites.

Formules chimiques de la production des différents corps  
dans cette fermentation de la Mannite.

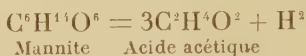
a) *Production des acides volatils.* — ACIDE FORMIQUE. — La formation de l'acide formique peut résulter soit d'une réaction d'oxydation au moyen de l'oxygène de l'eau, avec dégagement d'hydrogène, soit d'une simple décomposition de la substance avec production simultanée d'alcool et de gaz carbonique, sans dégagement d'hydrogène, suivant les formules respectives :



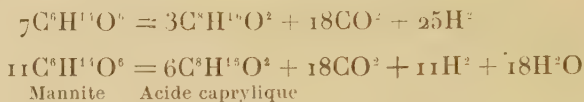
Chacun de ces modes de production peut d'ailleurs être accompagné d'une destruction partielle de l'acide formique primitivement formé, suivant l'équation constitutive :



ACIDE ACÉTIQUE. — Sa production résulte de la réaction :

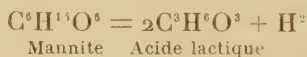


ACIDE CAPRYLIQUE. — En admettant que cet acide soit le représentant principal de l'acidité volatile insoluble, hypothèse justifiée par nos observations expérimentales, les formules suivantes rendent compte de sa formation :

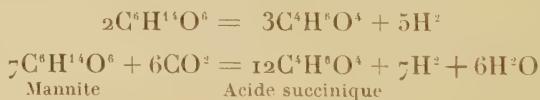


Chacune d'elles comportant un dégagement d'hydrogène et de gaz carbonique, la seconde libérant en outre de l'eau qui, le cas échéant, devra entrer dans la comptabilité générale des produits de la fermentation.

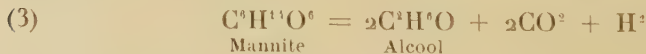
b) *Production des acides fixes.* — ACIDE LACTIQUE. — En se rappelant que la molécule de la mannite diffère de celle d'un sucre par deux atomes d'hydrogène en plus, nous retrouvons pour sa transformation en acide lactique une équation analogue à celle qui exprime le dédoublement du glucose en deux molécules de cet acide :



ACIDE SUCCINIQUE. — On peut attribuer à la formation de l'acide succinique l'une des deux réactions suivantes :



c) *Production de l'alcool éthylique.* — La formule directrice de production de l'alcool éthylique dans une fermentation de la mannite résulte encore du rapport de la constitution de sa molécule avec celle d'un sucre et se traduit par l'équation représentative de la fermentation alcoolique d'un hexose avec dégagement supplémentaire d'hydrogène :



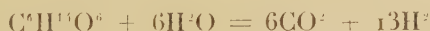
ce dernier gaz pouvant rester uni en partie ou en totalité à un égal volume d'acide carbonique pour constituer de l'acide formique dont la production serait alors concomitante de celle de l'alcool éthylique, suivant la formule (2), exprimant la génération de cet acide.

Toutefois, en raison de la quantité considérable d'hydrogène dégagé, quantité que ne suffisent pas à fournir les réactions de formation des autres corps s'effectuant avec dégagement de ce gaz, il est logique d'attribuer uniquement à la formule (1) la production d'acide formique; la formule (3) traduisant alors entièrement celle de l'alcool éthylique.

En se basant sur ces équations, si on calcule le volume d'hydrogène correspondant à la quantité précédemment évaluée par l'analyse, de chacun des acides et de l'alcool engendrés, en totalisant les résultats obtenus, on trouve que le volume de ce gaz ainsi calculé est notablement inférieur au volume réellement dégagé et mesuré; même en ne faisant choix que des formules de fermentation traduisant au maximum un dégagement de ce gaz; ainsi, cette comparaison donne :

|                                                  | Mesuré              | Calculé            |
|--------------------------------------------------|---------------------|--------------------|
| <i>Hydrogène</i> par litre du liquide fermenté : | 1912 <sup>cc</sup>  | 1700 <sup>cc</sup> |
|                                                  | Différence : 212 cc |                    |

Il en résulte qu'une autre cause au moins concourt encore à la production de l'hydrogène et nous pouvons la rapporter soit à la décomposition par le ferment lui-même d'une partie de l'acide formique, décomposition latérale à sa formation et engendrant un mélange à volumes égaux de gaz carbonique et hydrogène; soit, ce qui revient au même, à une combustion complète aux dépens de l'oxygène de l'eau, du carbone d'une partie de la mannite, ce qui entraîne une double libération d'hydrogène, ce gaz venant à la fois de la substance fermentescible et de l'eau; la formule traduisant cette combustion est alors représentée par l'équation (1), ainsi modifiée :



Cette conclusion est aussi motivée par la production de l'anhydride carbonique : en calculant le volume de ce gaz correspondant aux quantités respectives d'acide caprylique et d'alcool formés, et en totalisant les résultats obtenus, on trouve que le volume ainsi calculé est encore inférieur au volume dégagé; cette comparaison donne en effet :

|                                                      | Mesuré              | Calculé           |
|------------------------------------------------------|---------------------|-------------------|
| <i>Anhydride carbonique</i> , par litre de culture : | 1227 <sup>cc</sup>  | 984 <sup>cc</sup> |
|                                                      | Différence : 243 cc |                   |

soit, en faisant le départ du gaz carbonique respiratoire,

une différence volumétrique très approximativement égale à celle relevée plus haut pour l'hydrogène, résultat conforme aux considérations ci-dessus énoncées.

En un mot, nous retrouvons ici, à l'état plus ou moins achevé, cette combustion *intérieure* de la matière fermentescible, *aux dépens de l'oxygène de l'eau*, que l'on rencontre si fréquemment au cours des fermentations anaérobies.

---

### Essais de fermentation d'autres alcools polyatomiques

Parallèlement à la transformation de la mannite, des essais de fermentation ont été effectués avec la *dulcite* et l'*érythrite*.

En milieu minéral, le *Bacillus amaracrylus* ne consomme ni l'une ni l'autre de ces substances : en milieu peptoné, la fermentation commence, mais elle s'arrête bientôt, même en présence de carbonate de chaux.

---



## Fermentation des Hydrates de carbone

---

Nous avons étudié l'action du *Bacillus amaracrylus* sur les hydrates de carbone suivants :

MATIÈRES SUCRÉES. — Glucose, lévulose, galactose ; saccharose, lactose, maltose.

MATIÈRES AMYLACÉES. — Amidon, dextrine.

Le ferment consomme rapidement les sucres avec formation d'un abondant dégagement de gaz carbonique et d'hydrogène, qui se manifeste en général deux jours après l'ensemencement. Les autres produits reconnus à l'analyse sont les mêmes que ceux de la fermentation de la mannite, et nous allons retrouver encore dans ces transformations : l'alcool éthylique, les acides formique, acétique, un acide volatil insoluble présentant les caractères de l'acide caprylique ; enfin, les acides lactique et succinique.

Les saccharoses fermentent sans hydrolysatation préalable, au moins en dehors de la cellule : nous avons observé en effet une concordance constante entre les poids de sucre évalués par la déviation polarimétrique ou par la réduction de la liqueur de Fehling.

Au cours de la transformation du saccharose, nous n'avons pu constater sur une prise d'essai du liquide la réduction de la liqueur cupro-potassique.

Le *Bacillus amaracrylus* ne transforme pas l'amidon et n'agit que modérément sur la dextrine.

Comme pour la glycérine et la mannite, nous avons effectué ces fermentations en milieu peptoné ou en milieu minéral, sans carbonate de chaux, et en milieu minéral maintenu neutre par addition de cet agent de saturation. Nous ne reproduirons ici que les résultats de la fermentation en milieu minéral.

Les transformations par action fermentaire étant plus faciles et plus complètes en liqueur diluée qu'en solution

concentrée, nous avons opéré, comme pour la glycérine et la mannite, avec des liquides de culture renfermant, par litre, dix grammes de la substance fermentescible.

### Fermentation du Glucose

EN MILIEU MINÉRAL SANS CARBONATE DE CHAUX

Le milieu minéral de composition suivante :

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| Sulfate d'ammoniaque .....     | 4 gr. 70  |
| Phosphate monopotassique. .... | 0 gr. 75  |
| Sulfate de magnésie .....      | 0 gr. 10  |
| Glucose .....                  | 10 gr.    |
| Eau .....                      | Un litre. |

a été stérilisé à 120°, puis abandonné au refroidissement et ensemencé avec l'espèce pure : l'essai a été soumis aux conditions expérimentales de culture exposées tout au long pour la glycérine.

Le liquide devient bientôt le siège d'une fermentation active se continuant pendant une semaine environ et s'arrêtant sous l'influence paralysante des acides engendrés. Comme pour la mannite, dans cette fermentation partielle, nous n'avons fait que mesurer la proportion de sucre consommé, les gaz formés et l'acidité totale née dans le liquide, nous réservant d'étudier complètement cette transformation du glucose en présence de carbonate de chaux.

#### ANALYSE DES GAZ

*Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures et gaz dissous, par litre de culture :*

|                                      | Volume            | CO <sup>2</sup>   | H                 |
|--------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 <sup>er</sup> fractionnement.....  | 58 <sup>cc</sup>  | 8 <sup>cc</sup>   | 50 <sup>cc</sup>  |
| 2 <sup>e</sup> — .....               | 90                | 12                | 78                |
| 3 <sup>e</sup> — .....               | 79                | 11                | 68                |
| 4 <sup>e</sup> — (durée : 2 jours) . | 41                | 9                 | 32                |
| Total des gaz dégagés .....          | 268 <sup>cc</sup> | 40 <sup>cc</sup>  | 228 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous.....                     | 167 <sup>cc</sup> | 151 <sup>cc</sup> | 13 <sup>cc</sup>  |
| Gaz engendrés, par litre de culture. | 432 <sup>cc</sup> | 191 <sup>cc</sup> | 241 <sup>cc</sup> |

#### ANALYSE DU LIQUIDE

*Proportion de glucose consommé : 20.75 pour 100.*

ACIDITÉ TOTALE. — Elle équivaut à 0 gr. 825 d'acide acétique, par litre du liquide de fermentation.

## RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

|                                        |                       |                         |       |                                       |
|----------------------------------------|-----------------------|-------------------------|-------|---------------------------------------|
| Glucose transformé, pour cent.....     |                       |                         | 20.75 |                                       |
|                                        |                       | Par litre<br>de culture |       | Pour cent<br>de glucose<br>transformé |
| Gaz                                    | H.....                | 241 <sup>cc</sup>       |       | 11570 <sup>cc</sup>                   |
|                                        | CO <sup>2</sup> ..... | 191 <sup>cc</sup>       |       | 9168 <sup>cc</sup>                    |
| Acidité totale, en acide acétique. ... |                       | 08 <sup>r</sup> .825    |       | 39 <sup>gr</sup> .60                  |

### Fermentation du Glucose

EN MILIEU MINÉRAL EN PRÉSENCE DE CARBONATE DE CHAUX

Cette fermentation a été conduite comme celles de la glycérine et de la mannite, en opérant avec le liquide de culture de composition précédemment définie et additionné de dix grammes de carbonate de chaux pur par litre.

Elle a donné les résultats suivants, rapportés à un litre du liquide fermenté, c'est-à dire à dix grammes de glucose mis en expérience.

#### ANALYSE DES GAZ

*Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures, et gaz dissous, par litre de culture.*

|                                     | Volume             | CO <sup>2</sup>    | H                  |
|-------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 <sup>re</sup> fractionnement..... | 580 <sup>cc</sup>  | 268 <sup>cc</sup>  | 312 <sup>cc</sup>  |
| 2 <sup>e</sup> — .....              | 672                | 394                | 278                |
| 3 <sup>e</sup> — .....              | 502                | 307                | 195                |
| 4 <sup>e</sup> — .....              | 315                | 210                | 105                |
| 5 <sup>e</sup> — .....              | 260                | 168                | 92                 |
| 6 <sup>e</sup> — .....              | 204                | 140                | 64                 |
| 7 <sup>e</sup> — (durée: 5 jours)   | 162                | 118                | 44                 |
| Total des gaz dégagés.....          | 2695 <sup>cc</sup> | 1605 <sup>cc</sup> | 1090 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous.....                    | 430 <sup>cc</sup>  | 418 <sup>cc</sup>  | 12 <sup>cc</sup>   |
| Gaz engendrés, par litre de culture | 3125 <sup>cc</sup> | 2023 <sup>cc</sup> | 1102 <sup>cc</sup> |

*Acide carbonique provenant du carbonate de chaux.* — La quantité de carbonate de chaux dissous est égale à 5 gr. 07; en retranchant de ce nombre la fraction de 0 gr. 27 représentant la proportion de cette substance décomposée par l'acidité phosphorique du milieu de culture, il en résulte une quantité de 4 gr. 80 dissoute par les acides engendrés, à laquelle correspond un volume de 1070<sup>cc</sup> de gaz carbonique à déduire du volume total mesuré de ce gaz.

En définitive, le dégagement gazeux dans cette fermentation du glucose est constitué par :

$$\text{CO}^2 = 953^{\text{cc}} \quad \text{H} = 1102^{\text{cc}}$$

## ANALYSE DU LIQUIDE

Il présente une légère odeur sudorale, reconnaissable à la distillation ; une saveur fade de liquide fermenté ; sa réaction est neutre à l'orangé et il colore le tournesol en rouge vineux : il ne réduit pas la liqueur de Fehling.

*Proportion de glucose consommé : 100 pour 100.*

### Séparation des acides volatils et des acides fixes

Le liquide de fermentation provenant de un litre de culture est séparé du dépôt de carbonate et de phosphate de chaux que l'on épuise ensuite par l'eau bouillante. Au volume total de ce liquide et des eaux de lavage on ajoute une dissolution de 6 gr. 5 d'acide oxalique cristallisé, quantité suffisante pour libérer complètement les acides de leurs combinaisons avec la chaux, la potasse et l'ammoniaque ; puis on procède à l'extraction des acides volatils comme dans les fermentations précédentes.

### ACIDITÉ VOLATILE

L'opération de la séparation des acides volatils présente les particularités déjà observées au cours de la distillation des liquides de fermentation de la glycérine et de la mannite, relativement à l'aspect trouble, opalescent du distillatum dans lequel l'analyse qualitative révèle encore la présence des acides *formique* et *acétique*, ainsi que l'existence en très petite quantité d'au moins un acide volatil insoluble ou peu soluble dans l'eau, acidité insoluble vraisemblablement constituée en majeure partie par de l'acide *caprylique*. Ce distillatum renferme aussi de l'alcool éthylique.

### Acidité volatile insoluble.

Elle équivaut à 0 gr. 041 d'acide acétique, par litre de culture ; soit

$$0 \text{ gr. } 041 \times 2.4 = 0 \text{ gr. } 098$$

en acide caprylique, forme sous laquelle nous continuerons à représenter cette acidité.



### Acidité volatile soluble.

Elle est représentée par les acides formique, acétique, et par une trace d'acide supérieur un peu soluble dans l'eau.

*Acidité volatile soluble totale.* — L'acidité de ce mélange, provenant de un litre de culture, équivaut à 1 gr. 31 d'acide acétique.

ACIDE FORMIQUE. — 0 gr. 59 par litre du liquide de fermentation.

ACIDE ACÉTIQUE. — Comme dans les fermentations de la glycérine et de la mannite, il a été dosé après élimination de l'acide formique et par deux méthodes différentes.

a) *Dosage par opération acidimétrique.* — 0 gr. 461 d'acide acétique par litre du liquide de fermentation.

b) *Dosage par la méthode de Duclaux.*

| Fractionnements<br>successifs de 10 cc. | Eau de chaux      | Fractionnements<br>totalisés | Eau de chaux      |
|-----------------------------------------|-------------------|------------------------------|-------------------|
| 1 <sup>er</sup>                         | 9 <sup>cc</sup> 3 | 10 premiers cmc.             | 9 <sup>cc</sup> 3 |
| 2 <sup>e</sup>                          | 10. 1             | 20 —                         | 19. 4             |
| 3 <sup>e</sup>                          | 10. 4             | 30 —                         | 29. 8             |
| 4 <sup>e</sup>                          | 10. 8             | 40 —                         | 40. 6             |
| 5 <sup>e</sup>                          | 11. 6             | 50 —                         | 52. 2             |
| 6 <sup>e</sup>                          | 12. 8             | 60 —                         | 65. 0             |
| 7 <sup>e</sup>                          | 13. 8             | 70 —                         | 78. 8             |
| 8 <sup>e</sup>                          | 15. 5             | 80 —                         | 94. 3             |
| 9 <sup>e</sup>                          | 17. 5             | 90 —                         | 111. 8            |
| 10 <sup>e</sup>                         | 21. 4             | 100 —                        | 133. 2            |

Dans le tableau de ces nombres on retrouve encore l'irrégularité déjà observée dans l'accroissement des quantités d'eau de chaux saturantes, accroissement qui passe par un minimum entre le deuxième et le troisième terme; irrégularité due à la présence de traces d'un acide supérieur.

L'eau de chaux employée étant telle que un centimètre cube sature 0 gr. 0027 d'acide acétique, cette équivalence permet d'évaluer la quantité de cet acide contenue dans les cent premiers centimètres cubes par l'égalité :

$$133.2 \times 0^{\text{gr}}.0027 = 0^{\text{gr}}.3596$$

soit pour la totalité de l'acide acétique du liquide soumis à la distillation :

$$\frac{0^{\text{gr}}.3596 \times 100}{80} = 0^{\text{gr}}.449$$

Moyenne des deux résultats : 0<sup>gr</sup>.453 d'acide acétique, par litre de culture.

Acidité *volatile soluble* totale, en acide acétique :

|                                      |                                                    |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Acidité formique, en acide acétique, | 0 <sup>gr</sup> .59 × 1.304 = 0 <sup>gr</sup> .769 |
| — acétique —                         | 0 <sup>gr</sup> .455                               |
| Trouvé : 1 <sup>gr</sup> .31         | Calculé : 1 <sup>gr</sup> .224                     |

Acidité *volatile* totale (soluble et insoluble), en acide acétique, par litre de culture.

$$1^{\text{gr}}.31 + 0^{\text{gr}}.041 = 1^{\text{gr}}.351$$

#### ACIDITÉ FIXE

L'analyse qualitative de la liqueur résiduelle, après la séparation des acides volatils, révèle la présence des acides *lactique* et *succinique* : elle contient en outre un très minime excès d'acide oxalique.

L'analyse quantitative a été effectuée avec le dixième de cette liqueur et suivant les mêmes principes que pour les fermentations précédentes.

#### Dosage de l'acide succinique.

Poids du succinate et de l'oxalate de baryte : 0<sup>gr</sup>.3911 .

*Evaluation de l'oxalate de baryte.* — Il faut employer 3<sup>cc</sup>.4 de solution de permanganate de potasse titrée à 2 grammes par litre ;

$$\text{soit } 3.4 \times 0^{\text{gr}}.002 = 0^{\text{gr}}.0068 \text{ de permanganate}$$

ce qui correspond à  $2 \times 0^{\text{gr}}.0068 = 0^{\text{gr}}.0136$  d'acide oxalique cristallisé

$$\text{ou à } \frac{234}{126} \times 0^{\text{gr}}.0136 = 0^{\text{gr}}.0251 \text{ d'oxalate de baryte}$$

(C<sup>2</sup>O<sup>4</sup>Ba, 1/2 H<sup>2</sup>O).

Calcul de l'acide succinique :

$$\text{Succinate de baryte : } 0^{\text{gr}}.3911 - 0^{\text{gr}}.0251 = 0^{\text{gr}}.366$$

$$\text{Acide succinique : } 0^{\text{gr}}.366 \times 0.4664 = 0^{\text{gr}}.1707$$

soit 1 gr. 707 d'acide succinique par litre de culture.

$$\text{Acidité acétique équivalente : } 1^{\text{gr}}.707 \times 1.016 = 1^{\text{gr}}.734$$

### Dosage de l'acide lactique.

Poids du lactate de baryte anhydre : 0<sup>gr</sup>.5202

*Transformation du lactate de baryte en sulfate de baryte :*

|                              |                       |                       |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                              | Trouvé                | Calculé               |
| Poids du sulfate de baryte : | 0 <sup>gr</sup> .3904 | 0 <sup>gr</sup> .3847 |

Calcul de l'acide lactique :

Au moyen du lactate de baryte :  $0^{\text{gr}}.5202 \times 0.5714 = 0^{\text{gr}}.2972$

— sulfate de baryte :  $0^{\text{gr}}.3904 \times 0.7725 = 0^{\text{gr}}.3015$

soit, en moyenne, une quantité de 2 gr.993 d'acide lactique par litre du liquide de fermentation.

Acidité *acétique* équivalente :  $2^{\text{gr}}.993 \times 0.644 = 1^{\text{gr}}.927$

Acidité *fixe*, en acide acétique :  $1^{\text{gr}}.734 + 1^{\text{gr}}.927 = 3^{\text{gr}}.661$

ACIDITÉ TOTALE (volatile et fixe), en acide acétique, par litre du liquide de fermentation :

$$1^{\text{gr}}.351 + 3^{\text{gr}}.661 = 5^{\text{gr}}.012$$

D'après la quantité, 4 gr. 80, de carbonate de chaux dissoute par les acides engendrés, l'acidité totale serait équivalente à 5 gr. 76 d'acide acétique, nombre notablement supérieur au précédent ; mais il faut remarquer que dans l'évaluation de l'acidité totale que nous venons de faire, nous n'avons pas tenu compte de l'acide carbonique dégagé qui, lui aussi, contribue pour une part importante à la dissolution du carbonate calcaïque.

On peut se faire une idée de cette importance sachant que, dans le cas actuel, le volume de gaz carbonique existant en dissolution dans un litre du liquide fermenté est de 418<sup>cc</sup> et que ce gaz, en intervenant seulement sous le volume de 100<sup>cc</sup> pour dissoudre du carbonate de chaux, jouit d'une acidité équivalente à 0 gr. 52 d'acide acétique.

### Recherche et dosage des alcools.

L'étude du fractionnement de distillation mis à part au moment de la séparation des acides volatils, en vue de la recherche des représentants de la fonction alcool, révèle la présence de l'alcool *éthylrique*.

Cette recherche a été faite d'après les méthodes exposées

par détail dans l'étude de la fermentation de la glycérine, et la proportion d'alcool éthylique évaluée par ces différentes méthodes a été, en moyenne, de 2 gr. 20 par litre du liquide de culture.

### RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

| Glucose transformé, pour cent ..... |                       | 100                   |                                 |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------------|
|                                     |                       | Par litre de culture  | Pour cent de glucose transformé |
| Gaz {                               | H.....                | 1102 <sup>cc</sup>    | 11020 <sup>cc</sup>             |
|                                     | CO <sup>2</sup> ..... | 953 <sup>cc</sup>     | 9530 <sup>cc</sup>              |
| Acidité, en acide acétique {        | totale..              | 58 <sup>gr</sup> .012 | 50 <sup>gr</sup> .12            |
|                                     | volatile..            | 1 351                 | 13 51                           |
|                                     | fixe .....            | 3 661                 | 36 61                           |
| Acides volatils {                   | formique.....         | 0 59                  | 5 90                            |
|                                     | acétique... ..        | 0 455                 | 4 55                            |
|                                     | caprylique.....       | 0 098                 | 0 98                            |
| Acides fixes... {                   | lactique.....         | 2 993                 | 29 93                           |
|                                     | succinique .. ..      | 1 707                 | 17 07                           |
| Alcool éthylique... ..              |                       | 2 20                  | 22                              |

### RENDEMENT

|                               |                       |       |   |                          |
|-------------------------------|-----------------------|-------|---|--------------------------|
| Gaz {                         | H.....                | 0 098 | } | 18.868                   |
|                               | CO <sup>2</sup> ..... | 18.77 |   |                          |
| Acides volatils {             | formique..            | 5.90  | } | 11.41                    |
|                               | acétique... ..        | 4.53  |   |                          |
|                               | caprylique            | 0.98  |   |                          |
| Acides fixes... {             | lactique... ..        | 29.93 | } | 47 10                    |
|                               | succinique            | 17.07 |   |                          |
| Alcool éthylique .....        |                       | 22    |   | 22                       |
| Total des produits dosés..... |                       |       |   | 99.378 p. 100 de glucose |

### Fermentation du Lévéulose

EN MILIEU MINÉRAL SANS CARBONATE DE CHAUX

Le milieu minéral de composition suivante

|                               |           |
|-------------------------------|-----------|
| Sulfate d'ammoniaque .....    | 4 gr. 70  |
| Phosphate monopotassique..... | 0 gr. 75  |
| Sulfate de magnésie. ....     | 0 gr. 10  |
| Lévéulose .....               | 10 gr.    |
| Eau .....                     | Un litre. |



a été stérilisé à 120°, abandonné au refroidissement et commencé avec l'espèce pure : il a été soumis ensuite aux conditions de culture exposées pour la glycérine.

Le liquide devient bientôt le siège d'une fermentation active se continuant pendant une semaine et s'arrêtant sous l'influence paralysante des acides engendrés. Comme pour la mannite et le glucose, dans cette fermentation partielle, nous avons simplement évalué la proportion de sucre consommé, les gaz formés et l'acidité totale née dans le liquide, en nous réservant d'étudier complètement cette fermentation du lévulose en présence du carbonate de chaux.

#### ANALYSE DES GAZ

*Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures, et gaz dissous, par litre de culture :*

|                                         | Volume            | CO <sup>2</sup>   | H                 |
|-----------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 <sup>er</sup> fractionnement.....     | 60 <sup>cc</sup>  | 8 <sup>cc</sup>   | 52 <sup>cc</sup>  |
| 2 <sup>e</sup> — .....                  | 96                | 11                | 85                |
| 3 <sup>e</sup> — .....                  | 84                | 14                | 70                |
| 4 <sup>e</sup> — (durée : 2 jours)..... | 43                | 10                | 33                |
| Total des gaz dégagés....               | 283 <sup>cc</sup> | 43 <sup>cc</sup>  | 240 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous.....                        | 168 <sup>cc</sup> | 155 <sup>cc</sup> | 13 <sup>cc</sup>  |
| Gaz engendrés, par litre de culture.    | 451 <sup>cc</sup> | 198 <sup>cc</sup> | 253 <sup>cc</sup> |

#### ANALYSE DU LIQUIDE

*Proportion de lévulose consommé : 21.30 pour 100.*

ACIDITÉ TOTALE. — Elle équivaut à 0 gr. 864 d'acide acétique par litre du liquide de fermentation.

#### RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

Lévulose transformé, pour cent..... 21.30

|                                        | Par litre de culture | Pour cent de lévulose transformé |
|----------------------------------------|----------------------|----------------------------------|
| Gaz { H.....                           | 253 <sup>cc</sup>    | 118.6 <sup>cc</sup>              |
| { CO <sup>2</sup> .....                | 198 <sup>cc</sup>    | 92.94 <sup>cc</sup>              |
| Acidité totale, en acide acétique .... | 0gr.864              | 40gr.55                          |

## Fermentation du Lévulose

EN MILIEU MINÉRAL EN PRÉSENCE DE CARBONATE DE CHAUX

Cette opération a été conduite comme pour la transformation de la glycérine, en employant le liquide de culture de composition précédemment définie et additionné de dix grammes de carbonate de chaux pur par litre.

Elle a donné les résultats suivants rapportés à un litre du liquide de fermentation, c'est-à-dire à une quantité de dix grammes de lévulose mis en expérience.

### ANALYSE DES GAZ

*Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures, et gaz dissous, par litre de culture :*

|                                         | Volume             | CO <sup>2</sup>    | H                  |
|-----------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 <sup>er</sup> fractionnement.....     | 650 <sup>cc</sup>  | 277 <sup>cc</sup>  | 373 <sup>cc</sup>  |
| 2 <sup>e</sup> — .....                  | 783                | 445                | 338                |
| 3 <sup>e</sup> — .....                  | 541                | 305                | 236                |
| 4 <sup>e</sup> — .....                  | 332                | 180                | 152                |
| 5 <sup>e</sup> — .....                  | 270                | 149                | 121                |
| 6 <sup>e</sup> — .....                  | 200                | 115                | 85                 |
| 7 <sup>e</sup> — (durée : 4 jours)..... | 110                | 65                 | 45                 |
| Total des gaz dégagés.....              | 2886 <sup>cc</sup> | 1536 <sup>cc</sup> | 1350 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous.....                        | 520 <sup>cc</sup>  | 508 <sup>cc</sup>  | 12 <sup>cc</sup>   |
| Gaz engendrés, par litre de culture.    | 3466 <sup>cc</sup> | 2044 <sup>cc</sup> | 1362 <sup>cc</sup> |

*Acide carbonique provenant du carbonate de chaux.* — La quantité de carbonate de chaux dissous est égale à 5<sup>gr</sup>.25 ; en retranchant de ce nombre la fraction de 0<sup>gr</sup>.27 représentant la proportion de cette substance décomposée par l'acidité phosphorique du milieu de culture, il en résulte une quantité de 4<sup>gr</sup>.98 de carbonate de chaux dissous par les acides engendrés, à laquelle correspond un volume de 1110<sup>cc</sup> de gaz carbonique à déduire du volume total mesuré de ce gaz.

En définitive, le dégagement gazeux dans cette fermentation du lévulose est exprimé par :

$$\text{CO}^2 = 934^{\text{cc}} \quad \text{H} = 1362^{\text{cc}}$$

### ANALYSE DU LIQUIDE

Il présente les caractères organoleptiques déjà mentionnés dans les fermentations précédentes ; il est neutre à l'orangé et colore le tournesol en rouge vineux : il ne réduit plus la liqueur de Fehling.

*Proportion de lévulose consommé : 100 pour 100.*

### Séparation des acides volatils et des acides fixes.

Le liquide de fermentation provenant de un litre de culture est séparé du dépôt de carbonate et de phosphate de chaux que l'on épuise ensuite par l'eau bouillante. Au volume total de ce liquide et des eaux de lavage on ajoute une solution de 6 gr. 6 d'acide oxalique cristallisé, quantité suffisante pour libérer complètement les acides de leurs combinaisons avec la chaux, la potasse et l'ammoniaque, mais sans constituer un excès notable : en effet, il en faut déjà 6 gr. 30 pour précipiter la chaux et nous avons évalué à 0 gr. 35 la quantité de cet acide nécessaire pour saturer la potasse provenant de 0 gr. 48 de phosphate bipotassique, dans le cas où elle serait entrée totalement en combinaison avec les acides engendrés par suite de réactions secondaires entre les sels de chaux de ces acides et ce phosphate de potasse, ainsi que nous l'avons expliqué au chapitre de la fermentation de la glycérine.

On procède ensuite à l'extraction des acides volatils comme dans la transformation de cette substance en présence de carbonate de chaux et en milieu minéral.

#### ACIDITÉ VOLATILE

De même que dans les fermentations précédentes, le liquide de distillation résultant de cette extraction possède un aspect laiteux et présente parfois à sa surface, surtout au début de l'opération, quelques rares et fines gouttelettes huileuses, dues à un acide supérieur peu soluble.

L'analyse qualitative de ce distillatum révèle encore la présence des acides, *formique* et *acétique*, ainsi que d'une très petite quantité d'au moins un acide volatil insoluble ou peu soluble dans l'eau ; acidité insoluble vraisemblablement constituée en majeure partie par de l'acide *caprylique*. Il contient en outre de l'alcool éthylique.

#### Acidité volatile insoluble.

Cette acidité déterminée comme dans le cas de la glycérine, équivaut à 0 gr. 065 d'acide acétique par litre de culture, soit à  $0\text{ gr. }065 \times 2.4 = 0\text{ gr. }156$  d'acide caprylique, principal représentant, admis par nous, de cette acidité.

### Acidité volatile soluble.

Elle est représentée par les acides, formique, acétique, et par une trace d'acide supérieur, peu soluble dans l'eau.

*Acidité volatile soluble totale.* — L'acidité de ce mélange provenant de un litre de culture équivaut à 1 gr. 49 d'acide acétique.

ACIDE FORMIQUE : 0 gr. 52 par litre de liquide fermenté.

ACIDE ACÉTIQUE. — Comme dans les fermentations précédentes, il a été évalué par deux méthodes différentes, après élimination de l'acide formique.

a) *Dosage par acidimétrie.* — 0 gr. 570 d'acide acétique par litre du liquide de fermentation.

b) *Dosage par la méthode de Duclaux :*

| Fractionnements<br>successifs de 10 cc. | Eau de chaux       | Fractionnements<br>totalisés | Eau de chaux       |
|-----------------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|
| 1 <sup>er</sup>                         | 12 <sup>cc</sup> 5 | 10 premiers cmc.             | 12 <sup>cc</sup> 5 |
| 2 <sup>e</sup>                          | 13 4               | 20 —                         | 25 9               |
| 3 <sup>e</sup>                          | 13 6               | 30 —                         | 39 5               |
| 4 <sup>e</sup>                          | 14                 | 40 —                         | 53 5               |
| 5 <sup>e</sup>                          | 14 7               | 50 —                         | 68 2               |
| 6 <sup>e</sup>                          | 15 9               | 60 —                         | 84 1               |
| 7 <sup>e</sup>                          | 16 8               | 70 —                         | 100 9              |
| 8 <sup>e</sup>                          | 18 6               | 80 —                         | 119 5              |
| 9 <sup>e</sup>                          | 20 7               | 90 —                         | 140 2              |
| 10 <sup>e</sup>                         | 24 5               | 100 —                        | 164 7              |

Dans l'examen de ces nombres, on reconnaît encore une irrégularité de l'accroissement des quantités d'eau de chaux nécessaires à la saturation des fractionnements successifs, accroissement qui présente un minimum vers le troisième terme ; irrégularité due à la présence de traces d'un acide supérieur.

L'eau de chaux employée étant telle que un centimètre cube sature 0 gr. 0027 d'acide acétique, il en résulte que la quantité de cet acide contenue dans les cent premiers centimètres cubes est égale à

$$164.7 \times 0 \text{ gr. } 0027 = 0 \text{ gr. } 445$$

soit pour la totalité de l'acide acétique contenu dans les 110 cmc. du liquide soumis à la distillation :

$$\frac{0 \text{ gr. } 445 \times 100}{80} = 0 \text{ gr. } 556$$

Moyenne des deux résultats : 0 gr. 563 d'acide acétique par litre du liquide de fermentation.



Acidité *volatile soluble* totale, en acide acétique :

|                                       |          |                |           |           |
|---------------------------------------|----------|----------------|-----------|-----------|
| Acidité formique, en acide acétique : | 0 gr. 52 | $\times$ 1.304 | =         | 0 gr. 678 |
| — acétique                            | —        | —              |           | 0 gr. 563 |
| Trouvé :                              | 1 gr. 36 |                | Calculé : | 1 gr. 241 |

Acidité *volatile* totale (soluble et insoluble), en acide acétique, par litre du liquide de fermentation :

$$1 \text{ gr. } 36 + 0 \text{ gr. } 065 = 1 \text{ gr. } 425.$$

#### ACIDITÉ FIXE

L'analyse qualitative de la liqueur résiduelle, après la séparation des acides volatils, révèle la présence des acides *lactique et succinique* : elle contient en outre une très faible quantité d'acide oxalique.

L'analyse quantitative a été effectuée avec le dixième de cette liqueur et suivant la méthode exposée pour la fermentation de la glycérine.

#### Dosage de l'acide succinique.

Poids du succinate et de l'oxalate de baryte : 0 gr. 4424.

*Évaluation de l'oxalate de baryte.* — Il faut employer 3<sup>cc</sup> 3 de solution de permanganate de potasse titrée à 2 gr. par litre,

soit  $3.3 \times 0.087002 = 0.0870066$  de permanganate  
ce qui correspond à  $2 \times 0.0870066 = 0.01740132$  d'acide oxalique cristallisé

ou à  $\frac{234}{126} \times 0.01740132 = 0.031744$  d'oxalate de baryte  
(C<sup>2</sup>O<sup>4</sup>Ba, 1/2 H<sup>2</sup>O).

Calcul de l'acide succinique :

Succinate de baryte. 0 gr. 4224 — 0 gr. 0244 = 0 gr. 398

Acide succinique... 0 gr. 398  $\times$  0.4664 = 0 gr. 1856

soit 1 gr. 856 d'acide succinique par litre de culture.

Acidité *acétique* équivalente : 1 gr. 856  $\times$  1.016 = 1 gr. 886.

#### Dosage de l'acide lactique.

Poids du lactate de baryte anhydre : 0 gr. 483.

*Transformation du lactate de baryte en sulfate de baryte :*

|                                 | Trouvé     | Calculé    |
|---------------------------------|------------|------------|
| Poids du sulfate de baryte..... | 0 gr. 3710 | 0 gr. 3572 |

Calcul de l'acide lactique :

Au moyen du lactate de baryte.. 0 gr. 483  $\times$  0.5714 = 0 gr. 2759

— sulfate — .. 0 gr. 371  $\times$  0.7725 = 0 gr. 2865

soit, en moyenne, une quantité de 2 gr. 812 d'acide lactique par litre du liquide de fermentation.

Acidité *acétique* équivalente :  $2 \text{ gr. } 812 \times 0.644 = 1 \text{ gr. } 811$ .

Acidité *fixe*, en acide acétique :  $1^{\text{gr}}.886 + 1^{\text{gr}}.811 = 3^{\text{gr}}.697$

ACIDITÉ TOTALE (volatile et fixe), en acide acétique, par litre de culture :

$$1 \text{ gr. } 425 + 3 \text{ gr. } 697 = 5 \text{ gr. } 122$$

D'après la quantité de carbonate de chaux dissoute par les acides engendrés et égale à 4 gr. 98, l'acidité totale serait équivalente à 5 gr. 976 d'acide acétique. Ainsi que nous l'avons déjà fait remarquer dans les fermentations précédentes, la différence est due à l'acidité volatile carbonique dont nous n'avons pas tenu compte dans nos calculs et qui, elle aussi, contribue pour une part importante, difficile à apprécier exactement, à la dissolution du carbonate de chaux : à ce sujet, nous rappelons que nous avons relevé l'ordre de grandeur de cette équivalence acétique de l'acide carbonique dissous, à propos de la fermentation du glucose.

#### Recherche et dosage des alcools.

L'étude du fractionnement de distillation mis à part dans l'opération de la séparation des acides volatils, en vue de la recherche des représentants de la fonction alcool, révèle la présence de l'alcool *éthylrique*. Nous avons évalué sa proportion moyenne à 2 gr. 10 par litre du liquide de culture.

#### RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

|                                     |                       |                      |                                  |
|-------------------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------------------|
| Lévulose transformé, pour cent..... |                       | 100                  |                                  |
|                                     |                       | Par litre de culture | Pour cent de lévulose transformé |
| Gaz {                               | H.....                | 1362 <sup>cc</sup>   | 13620 <sup>cc</sup>              |
|                                     | CO <sup>2</sup> ..... | 934 <sup>cc</sup>    | 9340 <sup>cc</sup>               |
| Acidité, en acide acétique {        | totale ..             | 5 <sup>gr</sup> .122 | 51 <sup>gr</sup> .22             |
|                                     | volatile.             | 1 425                | 14 25                            |
|                                     | fixe ...              | 3 697                | 36 97                            |
| Acides volatils {                   | formique .....        | 0 52                 | 5 20                             |
|                                     | acétique.....         | 0 563                | 5 63                             |
|                                     | caprylique.....       | 0 156                | 1 56                             |
| Acides fixes {                      | lactique.....         | 2 812                | 28 12                            |
|                                     | succinique.....       | 1 856                | 18 56                            |
| Alcool éthylrique .....             |                       | 2 10                 | 21                               |

# RENDEMENT

|                                |   |                       |       |       |                     |
|--------------------------------|---|-----------------------|-------|-------|---------------------|
| Gaz                            | { | H.....                | 1.21  | }     | 19.61               |
|                                |   | CO <sup>2</sup> ..... | 18.40 |       |                     |
| Acides volatils                | { | formique.             | 5.20  | }     | 12.39               |
|                                |   | acétique .            | 5.63  |       |                     |
|                                |   | caprylique            | 1.56  |       |                     |
| Acides fixes                   | { | lactique..            | 28.12 | }     | 46.68               |
|                                |   | succinique            | 18.56 |       |                     |
| Alcool éthylique.....          |   | 21                    |       | 21    |                     |
| Total des produits dosés ..... |   |                       |       | 99.68 | p. 100 de lévulose. |

## Fermentation du Galactose

EN MILIEU MINÉRAL SANS CARBONATE DE CHAUX

L'opération a été effectuée en même temps que celles relatives au glucose et au lévulose et avec un ferment identique, provenant d'une même culture, ensemencé dans le milieu de composition suivante :

|                               |           |
|-------------------------------|-----------|
| Sulfate d'ammoniaque .....    | 4 gr. 70  |
| Phosphate monopôtassique..... | 0 gr. 75  |
| Sulfate de magnésie.....      | 0 gr. 10  |
| Galactose.....                | 10 gr.    |
| Eau.....                      | Un litre. |

## ANALYSE DES GAZ

*Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures, et gaz dissous, par litre de culture :*

|                                     | Volume            | CO <sup>2</sup>   | H                 |
|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 <sup>er</sup> fractionnement..... | 46 <sup>cc</sup>  | 6 <sup>cc</sup>   | 40 <sup>cc</sup>  |
| 2 <sup>e</sup> — .....              | 88                | 9                 | 79                |
| 3 <sup>e</sup> — .....              | 62                | 12                | 50                |
| 4 <sup>e</sup> — (durée : 3 jours)  | 39                | 10                | 29                |
| Total des gaz dégagés.....          | 235 <sup>cc</sup> | 37 <sup>cc</sup>  | 198 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous.....                    | 149 <sup>cc</sup> | 135 <sup>cc</sup> | 14 <sup>cc</sup>  |
| Gaz engendrés, par litre de culture | 384 <sup>cc</sup> | 172 <sup>cc</sup> | 212 <sup>cc</sup> |

## ANALYSE DU LIQUIDE

*Proportion de galactose consommé : 18.75 pour 100.*

ACIDITÉ TOTALE. — Elle équivaut à 0 gr. 740 d'acide acétique par litre du liquide de fermentation.

## RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

|                                             |                 |           |                      |                                   |
|---------------------------------------------|-----------------|-----------|----------------------|-----------------------------------|
| Galactose transformé pour cent. . . . .     |                 |           | 18.75                |                                   |
|                                             |                 |           | Par litre de culture | Pour cent de galactose transformé |
| Gaz                                         | H.              | . . . . . | 212 <sup>cc</sup>    | 11306 <sup>cc</sup>               |
|                                             | CO <sup>2</sup> | . . . . . | 172 <sup>cc</sup>    | 9173 <sup>cc</sup>                |
| Acidité totale, en acide acétique . . . . . |                 |           | 0gr.740              | 39gr.45                           |

## Fermentation du Galactose

### EN PRÉSENCE DE CARBONATE DE CHAUX

Cette fermentation a été effectuée en même temps que celles du glucose et du lévulose et avec le même ferment ensemencé dans le milieu de composition définie plus haut, préalablement additionné de dix grammes de carbonate de chaux pur, par litre.

Elle a donné lieu aux résultats suivants rapportés à un litre de culture, c'est-à-dire à dix grammes de galactose.

### ANALYSE DES GAZ

*Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures, et gaz dissous, par litre de culture :*

|                                         | Volume             | CO <sup>2</sup>    | H                  |
|-----------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 <sup>re</sup> fractionnement. . . . . | 380 <sup>cc</sup>  | 178 <sup>cc</sup>  | 202 <sup>cc</sup>  |
| 2 <sup>e</sup> — . . . . .              | 415                | 200                | 215                |
| 3 <sup>e</sup> — . . . . .              | 438                | 211                | 227                |
| 4 <sup>e</sup> — . . . . .              | 440                | 222                | 218                |
| 5 <sup>e</sup> — . . . . .              | 437                | 278                | 159                |
| 6 <sup>e</sup> — . . . . .              | 331                | 250                | 81                 |
| 7 <sup>e</sup> — (durée: 5 jours)       | 146                | 109                | 37                 |
| Total des gaz dégagés. . . . .          | 2587 <sup>cc</sup> | 1448 <sup>cc</sup> | 1139 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous. . . . .                    | 436 <sup>cc</sup>  | 423 <sup>cc</sup>  | 13 <sup>cc</sup>   |
| Gaz engendrés, par litre de culture     | 3023 <sup>cc</sup> | 1871 <sup>cc</sup> | 1152 <sup>cc</sup> |

*Acide carbonique provenant du carbonate de chaux.* — La quantité de carbonate de chaux dissous est égale à 4 gr. 95 : en retranchant de ce nombre la fraction de 0 gr. 27 représentant la proportion de cette substance décomposée par l'acidité phosphorique du milieu de culture, il en résulte une quantité de 4 gr. 68 dissoute par les acides engendrés, et à laquelle correspond un volume de 1013<sup>cc</sup> de gaz carbonique à déduire du volume total mesuré de ce gaz.

En définitive, le dégagement gazeux dans cette fermentation du galactose est constitué par :

$$\text{CO}^2 = 828^{\text{cc}}$$

$$\text{H} = 1152^{\text{cc}}$$



## ANALYSE DU LIQUIDE

Il présente les caractères organoleptiques déjà mentionnés dans les fermentations des substances précédentes, mannite, glucose, lévulose; il colore le tournesol en rouge vineux et sa réaction est neutre à l'orangé; il ne possède plus qu'un très faible pouvoir réducteur vis-à-vis de la liqueur de Fehling. Il est à remarquer que, la fermentation paraissant cependant terminée, cette légère réduction subsiste toujours avec le galactose, caractère qui ne se manifeste pas avec le glucose et le lévulose : nous allons l'attribuer à un reste de ce sucre, bien qu'elle puisse être due également à un corps réducteur né dans sa transformation.

*Proportion de galactose consommé : 98.4 pour 100.*

### Séparation des acides volatils et des acides fixes.

Le liquide de fermentation provenant de un litre de culture est séparé du dépôt de carbonate et de phosphate de chaux que l'on épuise ensuite par l'eau bouillante. Au volume total de ce liquide et des eaux de lavage, on ajoute une solution de 6 gr. 5 d'acide oxalique cristallisé, quantité suffisante pour libérer complètement les acides de leurs combinaisons avec la chaux, la potasse et l'ammoniaque, mais sans qu'il en reste un excès notable. On procède ensuite à l'extraction des acides volatils d'après la technique indiquée dans l'étude de la fermentation de la glycérine en milieu minéral, en présence de carbonate de chaux.

### ACIDITÉ VOLATILE

Le distillatum résultant de cette extraction est encore trouble et renferme comme dans les opérations précédentes les acides, *formique*, *acétique*, ainsi qu'une minime quantité d'au moins un acide insoluble ou peu soluble dans l'eau, acidité supérieure vraisemblablement constituée en majeure partie par de l'acide *caprylique*, en raison de la très grande analogie des caractères observés avec ceux de cet acide et déjà mentionnés dans l'étude de la fermentation de la glycérine.

Il contient également de l'alcool éthylique que l'on en extrait par une nouvelle distillation après saturation par la baryte.

**Acidité volatile insoluble.**

Elle équivaut à 0<sup>gr</sup>.057 d'acide acétique, par litre de culture ;  
soit à 0<sup>gr</sup>.057  $\times$  2.4 = 0<sup>gr</sup> 1 37 d'acide caprylique.

**Acidité volatile soluble.**

Elle est représentée par les acides, formique, acétique, et par une trace d'acide supérieur un peu soluble dans l'eau.

*Acidité totale.* — L'acidité de ce mélange, provenant de un litre de culture, est équivalente à 1 gr. 29 d'acide acétique.

ACIDE FORMIQUE. — 0 gr. 55, par litre de culture.

ACIDE ACÉTIQUE. — Cet acide a été dosé par deux méthodes, après élimination de l'acide formique.

a) *Dosage par acidimétrie.* — 0 gr. 621 d'acide acétique par litre de culture.

b) *Dosage par la méthode de Duclaux.*

| Fractionnements<br>successifs de 10cc. | Eau de chaux     | Fractionnements<br>totalisés | Eau de chaux     |
|----------------------------------------|------------------|------------------------------|------------------|
| 1 <sup>er</sup>                        | 14 <sup>cc</sup> | 10 premiers cmc.             | 14 <sup>cc</sup> |
| 2 <sup>e</sup>                         | 14.8             | 20 —                         | 28 8             |
| 3 <sup>e</sup>                         | 15.1             | 30 —                         | 43.9             |
| 4 <sup>e</sup>                         | 15.5             | 40 —                         | 59.4             |
| 5 <sup>e</sup>                         | 16.3             | 50 —                         | 75.7             |
| 6 <sup>e</sup>                         | 17.5             | 60 —                         | 93.2             |
| 7 <sup>e</sup>                         | 18.5             | 70 —                         | 111.7            |
| 8 <sup>e</sup>                         | 20.4             | 80 —                         | 132.1            |
| 9 <sup>e</sup>                         | 22.6             | 90 —                         | 154.7            |
| 10 <sup>e</sup>                        | 26.5             | 100 —                        | 181.2            |

L'examen de ces nombres révèle encore une irrégularité dans l'accroissement des quantités d'eau de chaux saturantes, et due à la présence de traces d'acide supérieur.

L'eau de chaux employée étant telle que un centimètre cube sature 0<sup>gr</sup> 0027 d'acide acétique, cette équivalence permet d'évaluer la quantité de cet acide contenue dans les cent premiers centimètres cubes par l'égalité :

$$181.2 \times 0^{\text{gr}}.0027 = 0^{\text{gr}}.489$$

soit pour la totalité de l'acide acétique du liquide soumis à la distillation :

$$\frac{0^{\text{gr}}.489 \times 100}{80} = 0^{\text{gr}}.611$$

Moyenne des deux résultats :  $0^{\text{gr}}.616$  d'acide acétique par litre du liquide de fermentation.

Acidité *volatile soluble* totale, en acide acétique :

$$\begin{array}{rcl} \text{Acidité formique, en acide acétique : } 0^{\text{gr}}.55 \times 1.304 & = & 0^{\text{gr}}.717 \\ \text{— acétique} & & \underline{0^{\text{gr}}.616} \\ \text{Trouvé : } 1^{\text{gr}}.290 & \quad \text{Calculé : } & 1^{\text{gr}}.333 \end{array}$$

Acidité *volatile* totale (soluble et insoluble), en acide acétique, par litre de culture :

$$1^{\text{gr}}.290 + 0^{\text{gr}}.057 = 1^{\text{gr}}.347$$

#### ACIDITÉ FIXE

L'analyse qualitative de la liqueur qui reste après l'extraction des acides volatils révèle la présence des acides *lactique* et *succinique* ; elle contient en outre une minime quantité d'acide oxalique.

L'analyse quantitative a été effectuée avec le dixième de cette liqueur et suivant la méthode précédemment exposée.

#### Dosage de l'acide succinique.

Poids du succinate et de l'oxalate de baryte :  $0^{\text{gr}}.3800$

*Evaluation de l'oxalate de baryte.* — Il faut employer  $4^{\text{cc}}8$  de solution de permanganate de potasse à 2 grammes par litre,

$$\begin{array}{l} \text{soit } 4.8 \times 0^{\text{gr}}.002 = 0^{\text{gr}}.0096 \text{ de permanganate} \\ \text{ce qui correspond à } 2 \times 0^{\text{gr}}.0096 = 0^{\text{gr}}.0192 \text{ d'acide oxalique cristallisé} \\ \text{ou à } \frac{234}{126} \times 0^{\text{gr}}.0192 = 0^{\text{gr}}.0355 \text{ d'oxalate de baryte} \\ \hspace{15em} (\text{C}^2\text{O}^4\text{Ba}, 1/2 \text{H}^2\text{O}). \end{array}$$

Calcul de l'acide succinique :

$$\begin{array}{rcl} \text{Succinate de baryte : } & 0^{\text{gr}}.3800 - 0^{\text{gr}}.0355 & = 0^{\text{gr}}.3445 \\ \text{Acide succinique : } & 0^{\text{gr}}.3445 \times 0.4664 & = 0^{\text{gr}}.1606 \end{array}$$

soit 1 gr. 606 d'acide succinique par litre de culture.

$$\text{Acidité acétique équivalente : } 1^{\text{gr}}.606 \times 1.016 = 1^{\text{gr}}.632$$

### Dosage de l'acide lactique.

Poids du lactate de baryte anhydre : 0<sup>gr</sup>.468

*Transformation du lactate de baryte en sulfate de baryte :*

|                              |                       |                       |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                              | Trouvé                | Calculé               |
| Poids du sulfate de baryte : | 0 <sup>gr</sup> .3550 | 0 <sup>gr</sup> .3461 |

Calcul de l'acide lactique :

Au moyen du lactate de baryte : 0<sup>gr</sup>.468  $\times$  0.5714 = 0<sup>gr</sup>.2674  
 — sulfate de baryte : 0<sup>gr</sup>.355  $\times$  0.7725 = 0<sup>gr</sup>.2742

soit, en moyenne, une quantité de 2 gr. 708 d'acide lactique par litre du liquide de fermentation.

Acidité *acétique* équivalente : 2<sup>gr</sup>.708  $\times$  0.644 = 1<sup>gr</sup>.744

Acidité *fixe*, en acide acétique, par litre de culture :

1<sup>gr</sup>.632 + 1<sup>gr</sup>.744 = 3<sup>gr</sup>.376

ACIDITÉ TOTALE (volatile et fixe), en acide acétique, par litre de culture :

1<sup>gr</sup>.347 + 3<sup>gr</sup>.376 = 4<sup>gr</sup>.723

D'après la quantité de carbonate de chaux dissoute par les acides engendrés et égale à 4 gr. 68, l'acidité totale serait équivalente à 5 gr. 616 d'acide acétique. De même que dans les fermentations précédentes, la différence entre ces deux nombres exprimant les acidités dosée et calculée, est due à l'acidité carbonique qui n'intervient pas dans nos évaluations et qui, elle aussi, contribue pour une part importante à la dissolution du carbonate de chaux, part difficile à estimer exactement, autrement que par cette différence elle-même.

### Recherche et dosage des alcools.

L'étude du fractionnement de distillation mis à part dans l'opération de la séparation des acides volatils, en vue de la recherche des représentants de la fonction alcool, révèle la présence de l'alcool *éthylrique*.

La proportion moyenne a été estimée, par les méthodes exposées dans la fermentation de la glycérine, à 1 gr. 95 par litre du liquide de culture.



# RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

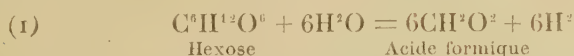
|                                      |                       |                      |      |                                   |
|--------------------------------------|-----------------------|----------------------|------|-----------------------------------|
| Galactose transformé, pour cent..... |                       |                      | 98.4 |                                   |
|                                      |                       | Par litre de culture |      | Pour cent de galactose transformé |
| Gaz {                                | H.....                | 1152 <sup>cc</sup>   |      | 11704 <sup>cc</sup>               |
|                                      | CO <sup>2</sup> ..... | 828 <sup>cc</sup>    |      | 8412 <sup>cc</sup>                |
| Acidité, en acide acétique {         | totale....            | 48 <sup>r</sup> .723 |      | 478 <sup>r</sup> .98              |
|                                      | volatile..            | 1 347                |      | 13 68                             |
|                                      | fixe .....            | 3 376                |      | 34 30                             |
| Acides volatils {                    | formique.....         | 0 55                 |      | 5 58                              |
|                                      | acétique .....        | 0 616                |      | 6 26                              |
|                                      | caprylique .....      | 0 137                |      | 1 39                              |
| Acides fixes... {                    | lactique .....        | 2 708                |      | 27 51                             |
|                                      | succinique .....      | 1 606                |      | 16 31                             |
| Alcool éthylique .....               |                       | 1 95                 |      | 19 81                             |

## RENDEMENT

|                               |   |                       |       |   |                           |
|-------------------------------|---|-----------------------|-------|---|---------------------------|
| Gaz                           | { | H.....                | 1.04  | } | 17.61                     |
|                               |   | CO <sup>2</sup> ..... | 16.57 |   |                           |
| Acides volatils               | { | formique..            | 5.58  | } | 13.23                     |
|                               |   | acétique ..           | 6.26  |   |                           |
|                               |   | caprylique            | 1.39  |   |                           |
| Acides fixes...               | { | lactique...           | 27.51 | } | 43.82                     |
|                               |   | succinique            | 16.31 |   |                           |
| Alcool éthylique.....         |   |                       | 19.81 |   | 19.81                     |
| Total des produits dosés..... |   |                       |       |   | 94.47 p. 100 de galactose |

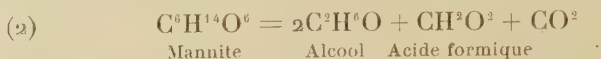
## Formules chimiques de la production des différents corps dans cette fermentation des Hexoses.

a) *Production des acides volatils.* — ACIDE FORMIQUE. — Aucune formule ne peut faire dériver directement l'acide formique de la fermentation d'un sucre. Cet acide doit être engendré par une réaction d'oxydation dans laquelle l'eau fournit de l'oxygène et libère en même temps son hydrogène :



On peut encore concevoir la production de l'acide formique comme précédée de celle d'un alcool hexatomique par hydrogénation d'un

sucrer; cette nouvelle molécule étant ensuite dissociée en acide formique, alcool éthylique et acide carbonique, suivant la formule de décomposition précédemment donnée pour la mannite :



Chacun de ces modes de formation peut être suivi de la destruction partielle de l'acide formique.

ACIDE ACÉTIQUE. — On peut attribuer à la formation de l'acide acétique deux formules directrices : l'une,

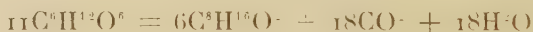
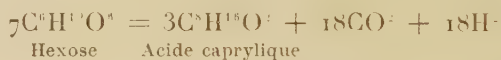


qui représente une dislocation pure et simple, une dépolymérisation, en quelque sorte, de la molécule sucrée, s'effectuant sans aucun dégagement gazeux ; l'autre,



avec production des gaz carbonique et hydrogène et qui correspond à une combustion intérieure au moyen de l'oxygène de l'eau.

ACIDE CAPRYLIQUE. — En admettant que cet acide soit le représentant principal de l'acidité volatile insoluble, hypothèse fondée sur l'observation expérimentale, les formules suivantes, avec ou sans dégagement d'hydrogène, rendent compte de sa formation :



b) *Production des acides fixes.* — ACIDE LACTIQUE. — La production de l'acide lactique aux dépens d'un hexose est représentée par la formule classique de dédoublement suivante :

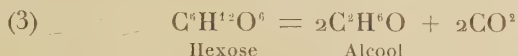


Dans le bilan des opérations, l'acide lactique procédant d'un sucre sans dégagement gazeux, donne par conséquent un rendement théorique de cent pour cent.

ACIDE SUCCINIQUE. — On peut attribuer à la formation de l'acide succinique l'une des deux formules suivantes : la première dégageant de l'hydrogène, la seconde fixant de l'acide carbonique :



c) *Production de l'alcool éthylique.* — Elle s'accomplit vraisemblablement suivant la formule classique de la fermentation alcoolique :

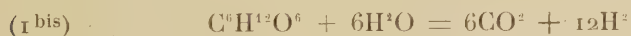


Nous avons vu que, suivant la formule (2) donnée plus haut, la production de l'alcool éthylique peut reconnaître une autre origine, commune avec celle de l'acide formique, par formation intermédiaire d'un alcool hexatomique.

Si, à l'aide de ces équations, on calcule le volume d'hydrogène correspondant à la quantité précédemment évaluée de chacun des acides formés, dans l'une quelconque des fermentations des hexoses, et si on totalise les résultats obtenus, le volume de ce gaz ainsi calculé est sensiblement inférieur au volume réellement dégagé et mesuré, même en ne faisant choix que des formules traduisant un dégagement de ce gaz.

Il en résulte qu'une autre cause, au moins, concourt encore à la production de l'hydrogène et nous pouvons la rapporter à la décomposition d'une partie de l'acide formique, ainsi que nous le faisons prévoir plus haut, destruction latérale à sa formation et engendrant un mélange gazeux à volumes égaux d'hydrogène et d'acide carbonique.

Sans qu'il soit nécessaire d'avoir recours à cette production intermédiaire d'acide formique, nous pouvons aussi supposer que, par une combustion complète aux dépens de l'oxygène de l'eau, tout le carbone d'une partie de la molécule sucrée est entièrement brûlé; la formule traduisant cette combustion étant alors représentée par l'équation (1) ainsi modifiée :



En ce qui concerne la comptabilité de l'acide carbonique, nous voyons que la principale source de sa production est corrélatrice de celle de l'alcool éthylique. Or, si celle-ci s'accomplissait uniquement suivant la formule (3), le volume d'acide carbonique calculé par rapport à la quantité d'alcool trouvée serait supérieur au volume dégagé, et nous savons que ce gaz a encore d'autres origines : nous devrions alors admettre que de l'acide carbonique se fixe sur d'autres molécules, comme la substance fermentescible elle-même

pour donner naissance à l'acide succinique. Plus simplement le compte de ce gaz se trouvera équilibré s'il reste en partie combiné à de l'hydrogène à l'état d'acide formique; cette dernière synthèse pouvant ne pas être directe, mais résulter de l'hydrogénation préalable de la matière sucrée suivie de sa décomposition en alcool, acide formique et acide carbonique.

Il suffit de jeter un coup d'œil sur les formules (2) et (3) qui traduisent ces réactions productives d'alcool pour se rendre compte que pour une quantité déterminée de cette substance le volume de gaz carbonique fourni par la première est la moitié de celui donné par la seconde : la dernière hypothèse que nous venons d'énoncer permet ainsi de rétablir l'équilibre dans le compte de l'acide carbonique.

En résumé, les formules les plus simples exprimant la production qualitative de chacun des corps considérés ne suffisent pas à la représentation quantitative du phénomène : leur ensemble fournissant un déficit en hydrogène et un excédent en gaz carbonique. Pour équilibrer la production de ces deux gaz, il est nécessaire d'envisager d'autres réactions, et parmi elles, il est vraisemblable de rechercher l'appoint en hydrogène dans ce gaz résultant d'une combustion intérieure de la matière fermentescible aux dépens de l'oxygène de l'eau, en remarquant que l'équation (1<sup>bis</sup>) qui la traduit donne un dégagement d'hydrogène double de celui de l'acide carbonique : il est également naturel d'admettre une fixation de ce dernier gaz, postérieure à sa formation, ou antérieure en tant qu'élément constituant de la molécule formique.

*Éléments non dosés.* — Dans chacun des écarts à cent fournis par les rendements de fermentation des hexoses précédents, doivent figurer les éléments de la matière sucrée qui sont immobilisés pour former le corps des microbes et les déchets de leur vie.

Dans l'appréciation de ces rendements, il est utile de remarquer que pour établir le bilan de fermentation nous avons eu besoin de recourir à une réaction exigeant la décomposition de l'eau, laquelle fournit au compte pondéral des produits obtenus, seulement une minime quantité d'hydrogène et d'oxygène non pesés au départ.

Enfin, et comme terme de correction de signe contraire



au précédent, nous devons aussi mentionner la petite quantité d'eau pouvant être libérée d'un hexose dans la formation de l'acide caprylique et de l'acide succinique.

## Fermentation du Saccharose

EN MILIEU MINÉRAL SANS CARBONATE DE CHAUX

Le milieu minéral de composition suivante :

|                              |           |
|------------------------------|-----------|
| Sulfate d'ammoniaque.....    | 4 gr. 70  |
| Phosphate monopotassique.... | 0 gr. 75  |
| Sulfate de magnésie. ....    | 0 gr. 10  |
| Saccharose.....              | 10 gr.    |
| Eau... ..                    | Un litre. |

a été stérilisé à 120°, puis abandonné au refroidissement et ensemencé avec l'espèce pure : l'essai a été soumis aux conditions expérimentales de culture précédemment exposées pour les substances fermentescibles déjà examinées.

Le liquide devient bientôt le siège d'une fermentation active se continuant pendant une semaine environ et s'arrêtant sous l'influence paralysante des acides engendrés. Comme pour la mannite et les hexoses, dans cette fermentation partielle, nous n'avons fait que mesurer la proportion de sucre consommé, les gaz formés et l'acidité totale née dans le liquide, nous réservant d'étudier complètement cette transformation du saccharose en présence de carbonate de chaux.

## ANALYSE DES GAZ

*Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures, et gaz dissous, par litre de culture :*

|                                         | Volume            | CO <sub>2</sub>   | H                 |
|-----------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 <sup>er</sup> fractionnement.....     | 50 <sup>cc</sup>  | 6 <sup>cc</sup>   | 44 <sup>cc</sup>  |
| 2 <sup>e</sup> — .....                  | 88                | 10                | 78                |
| 3 <sup>e</sup> — .....                  | 73                | 9                 | 64                |
| 4 <sup>e</sup> — (durée : 2 jours)..... | 37                | 7                 | 30                |
| Total des gaz dégagés.....              | 248 <sup>cc</sup> | 32 <sup>cc</sup>  | 216 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous.....                        | 160 <sup>cc</sup> | 148 <sup>cc</sup> | 12 <sup>cc</sup>  |
| Gaz engendrés, par litre de culture     | 408 <sup>cc</sup> | 180 <sup>cc</sup> | 228 <sup>cc</sup> |

# ANALYSE DU LIQUIDE

*Proportion de saccharose consommé : 19.92 pour 100.*

ACIDITÉ TOTALE. — Elle équivaut à 0 gr. 80 d'acide acétique par litre de culture.

A aucun moment de la fermentation nous n'avons pu constater la réduction de la liqueur cupro-potassique avec une prise d'essai du liquide.

## RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

Saccharose transformé, pour cent. . . . . 19.92

|                                         |                       | Par litre<br>de culture | Pour cent<br>de saccharose<br>transformé |
|-----------------------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------------------------|
| Gaz {                                   | H .....               | 228 <sup>cc</sup>       | 11446 <sup>cc</sup>                      |
|                                         | CO <sup>2</sup> ..... | 180 <sup>cc</sup>       | 9037 <sup>cc</sup>                       |
| Acidité totale, en acide acétique. .... |                       | 0gr. 80                 | 40gr. 16                                 |

## Fermentation du Saccharose

EN MILIEU MINÉRAL EN PRÉSENCE DE CARBONATE DE CHAUX

Le milieu de composition définie plus haut, additionné de dix grammes de carbonate de chaux pur, par litre, a été ensemencé après stérilisation.

La fermentation conduite comme les précédentes a donné les résultats suivants rapportés à un litre de culture, c'est-à-dire à dix grammes de saccharose.

## ANALYSE DES GAZ

*Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures, et gaz dissous, par litre de culture :*

|                                      |  | Volume             | CO <sup>2</sup>    | H                  |
|--------------------------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 <sup>er</sup> fractionnement. .... |  | 120 <sup>cc</sup>  | 200 <sup>cc</sup>  | 220 <sup>cc</sup>  |
| 2 <sup>e</sup> — .....               |  | 440                | 225                | 215                |
| 3 <sup>e</sup> — .....               |  | 452                | 255                | 197                |
| 4 <sup>e</sup> — .....               |  | 456                | 286                | 170                |
| 5 <sup>e</sup> — .....               |  | 450                | 300                | 150                |
| 6 <sup>e</sup> — .....               |  | 412                | 262                | 150                |
| 7 <sup>e</sup> — (durée : 3 jours).  |  | 75                 | 55                 | 20                 |
| Total des gaz dégagés. ....          |  | 2705 <sup>cc</sup> | 1583 <sup>cc</sup> | 1122 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous .....                    |  | 440 <sup>cc</sup>  | 427 <sup>cc</sup>  | 13 <sup>cc</sup>   |
| Gaz engendrés, par litre de culture  |  | 3145 <sup>cc</sup> | 2010 <sup>cc</sup> | 1135 <sup>cc</sup> |

*Acide carbonique provenant du carbonate de chaux.* — La quantité de carbonate de chaux dissous est égale à 5<sup>gr</sup>.20 : en retranchant de ce nombre la fraction de 0<sup>gr</sup>.27, représentant la proportion de cette substance décomposée par l'acidité phosphorique du milieu de culture, il en résulte une quantité de 4<sup>gr</sup>.93 dissoute par les acides engendrés, à laquelle correspond un volume de 1099<sup>cc</sup> de gaz carbonique à déduire du volume total mesuré de ce gaz.

En définitive, le dégagement gazeux dans cette fermentation du saccharose est constitué par :

$$\text{CO}^2 = 911^{\text{cc}}$$

$$\text{H} = 1135^{\text{cc}}$$

#### ANALYSE DU LIQUIDE

Il présente les caractères organoleptiques déjà observés et mentionnés à propos des fermentations précédentes ; sa réaction est neutre à l'orangé et légèrement acide au tournesol qu'il colore en rouge vineux par l'acide carbonique dissous : il ne réduit la liqueur de Fehling, ni avant, ni après intervention.

*Proportion de saccharose consommé : 100 pour 100.*

#### Séparation des acides volatils et des acides fixes

Le liquide de fermentation provenant de un litre de culture est séparé du dépôt de carbonate et de phosphate de chaux que l'on épuise ensuite par l'eau bouillante. Au volume total de ce liquide et des eaux de lavage, on ajoute une solution de 6 gr. 5 d'acide oxalique cristallisé, quantité suffisante pour libérer complètement les acides de leurs combinaisons avec la chaux, la potasse et l'ammoniaque ; puis on procède à l'extraction des acides volatils comme dans les fermentations précédentes.

#### ACIDITÉ VOLATILE

Au cours de l'opération de l'isolement des acides volatils, on observe les particularités déjà mentionnées dans les fermentations de la glycérine, de la mannite et des hexoses, relativement à l'aspect trouble, opalescent, du liquide qui passe à la distillation. L'analyse qualitative de ce liquide révèle la présence des acides *formique* et *acétique*, ainsi que l'existence en très petite quantité d'au moins un acide volatil insoluble ou peu soluble dans l'eau ; acidité inso-

luble vraisemblablement constituée en majeure partie par de l'acide *caprylique*, en raison des caractères d'essai déjà rappelés.

Comme dans les fermentations précédentes, ce distillatum renferme aussi de l'alcool éthylique.

#### Acidité volatile insoluble.

Elle équivaut à 0 gr. 068 d'acide acétique par litre de culture, soit à  $0 \text{ gr. } 068 \times 2.4 = 0 \text{ gr. } 163$  d'acide caprylique.

#### Acidité volatile soluble.

Elle est représentée par les acides formique, acétique et par une trace d'acide supérieur très peu soluble dans l'eau.

*Acidité totale.* — L'acidité de ce mélange, provenant de un litre de culture, équivaut à 1 gr. 24 d'acide acétique.

ACIDE FORMIQUE. — 0 gr. 48 par litre de culture.

ACIDE ACÉTIQUE. — Cet acide a été évalué par deux méthodes, après élimination de l'acide formique.

a) *Dosage par acidimétrie.* — 0 gr. 549 d'acide acétique, par litre de culture.

b) *Dosage par la méthode de Duclaux :*

| Fractionnements<br>successifs de 10 cc. | Eau de chaux       | Fractionnements<br>totalisés | Eau de chaux       |
|-----------------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|
| 1 <sup>er</sup> .                       | 11 <sup>cc</sup> 4 | 10 premiers cmc.             | 11 <sup>cc</sup> 4 |
| 2 <sup>e</sup>                          | 12. 4              | 20 —                         | 23. 8              |
| 3 <sup>e</sup>                          | 12. 5              | 30 —                         | 36. 3              |
| 4 <sup>e</sup>                          | 13.                | 40 —                         | 49. 3              |
| 5 <sup>e</sup>                          | 13. 7              | 50 —                         | 63. 0              |
| 6 <sup>e</sup>                          | 14. 8              | 60 —                         | 77. 8              |
| 7 <sup>e</sup>                          | 15. 9              | 70 —                         | 93. 7              |
| 8 <sup>e</sup>                          | 17. 6              | 80 —                         | 111. 3             |
| 9 <sup>e</sup>                          | 19. 7              | 90 —                         | 131. 0             |
| 10 <sup>e</sup>                         | 23. 8              | 100 —                        | 154. 8             |

Dans le tableau de ces nombres, on remarque l'irrégularité déjà constatée dans les fermentations précédentes relativement à l'accroissement des quantités d'eau de chaux saturantes, accroissement qui passe par un minimum entre le deuxième et le troisième terme; irrégularité due à la présence de traces d'un acide supérieur.



L'eau de chaux employée étant telle que un centimètre cube sature 0<sup>gr</sup>.0028 d'acide acétique, cette équivalence permet d'évaluer la quantité de cet acide contenue dans les cent premiers centimètres cubes par l'égalité :

$$154.8 \times 0^{\text{gr}}.0028 = 0^{\text{gr}}.433$$

soit pour la totalité de l'acide acétique du liquide soumis à la distillation :

$$\frac{0^{\text{gr}}.433 \times 100}{80} = 0^{\text{gr}}.541$$

Moyenne des deux résultats : 0 gr. 545 d'acide acétique, par litre du liquide de fermentation.

Acidité *volatile soluble* totale, en acide acétique :

$$\begin{array}{rcl} \text{Acidité formique, en acide acétique : } 0^{\text{gr}}.48 \times 1.304 & = & 0^{\text{gr}}.626 \\ \text{— acétique, —} & & \underline{0^{\text{gr}}.545} \end{array}$$

$$\text{Trouvé : } 1^{\text{gr}}.24 \qquad \text{Calculé : } 1^{\text{gr}}.171$$

Acidité *volatile* totale (soluble et insoluble), en acide acétique, par litre de culture :

$$1^{\text{gr}}.24 + 0^{\text{gr}}.068 = 1^{\text{gr}}.308$$

#### ACIDITÉ FIXE

L'analyse qualitative de la liqueur qui reste après l'extraction des acides volatils révèle la présence des acides *lactique* et *succinique* : elle contient, en outre, une minime quantité d'acide oxalique. L'acide lactique formé est constitué par un mélange de ses représentants inactif et droit.

L'analyse quantitative a été effectuée avec le dixième du volume de cette liqueur et suivant la méthode indiquée.

#### Dosage de l'acide succinique.

Poids du succinate et de l'oxalate de baryte : 0<sup>gr</sup>.4012

*Évaluation de l'oxalate de baryte.* — Il faut employer 2<sup>cc</sup> de solution de permanganate de potasse à 2 grammes par litre,

$$\text{soit } 2 \times 0^{\text{gr}}.002 = 0^{\text{gr}}.004 \text{ de permanganate}$$

ce qui correspond à  $2 \times 0^{\text{gr}}.004 = 0^{\text{gr}}.008$  d'acide oxalique cristallisé

$$\text{ou à } \frac{234}{126} \times 0^{\text{gr}}.008 = 0^{\text{gr}}.0148 \text{ d'oxalate de baryte}$$

(C<sup>2</sup>O<sup>4</sup>Ba, 1/2 H<sup>2</sup>O).

### Calcul de l'acide succinique :

$$\text{Succinate de baryte : } 0^{\text{gr}}.4012 - 0^{\text{gr}}.0148 = 0^{\text{gr}}.3864$$

$$\text{Acide succinique : } 0^{\text{gr}}.3864 \times 0.4664 = 0^{\text{gr}}.1802$$

soit 1 gr. 802 d'acide succinique par litre de culture.

$$\text{Acidité acétique équivalente : } 1^{\text{gr}}.802 \times 1.016 = 1^{\text{gr}}.831$$

### Dosage de l'acide lactique.

$$\text{Poids du lactate de baryte anhydre : } 0^{\text{gr}}.473$$

*Transformation du lactate de baryte en sulfate de baryte :*

|                              | Trouvé                | Calculé               |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Poids du sulfate de baryte : | 0 <sup>gr</sup> .3542 | 0 <sup>gr</sup> .3498 |

### Calcul de l'acide lactique :

$$\text{Au moyen du lactate de baryte : } 0^{\text{gr}}.473 \times 0.5714 = 0^{\text{gr}}.2702$$

$$\text{— sulfate de baryte : } 0^{\text{gr}}.3542 \times 0.7725 = 0^{\text{gr}}.2736$$

soit, en moyenne, une quantité de 2 gr. 719 d'acide lactique par litre du liquide de fermentation.

$$\text{Acidité acétique équivalente : } 2^{\text{gr}}.719 \times 0.644 = 1^{\text{gr}}.751$$

Acidité fixe, en acide acétique, par litre de culture :

$$1^{\text{gr}}.831 + 1^{\text{gr}}.751 = 3^{\text{gr}}.582$$

ACIDITÉ TOTALE (volatile et fixe), en acide acétique, par litre de culture :

$$1^{\text{gr}}.308 + 3^{\text{gr}}.582 = 4^{\text{gr}}.890$$

D'après la quantité de carbonate de chaux dissoute par les acides engendrés et égale à 4 gr. 93, l'acidité totale serait équivalente à 5 gr. 916 d'acide acétique, nombre notablement supérieur au précédent : comme dans les fermentations précédentes, la différence entre l'acidité dosée et l'acidité ainsi calculée est due à l'acide carbonique, qui contribue, lui aussi, pour une part importante, à la dissolution du carbonate de chaux.

### Recherche et dosage des alcools.

L'étude du fractionnement mis à part dans l'opération de la séparation des acides volatils en vue de la recherche des représentants de la fonction alcool, révèle la présence de l'alcool *éthylrique*.

La proportion moyenne établie d'après les différentes méthodes exposées dans l'étude de la fermentation de la glycérine est de 2 gr. 28, par litre de culture.

### RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

| Saccharose transformé, pour cent . . . . . |                           | 100                  |                                    |
|--------------------------------------------|---------------------------|----------------------|------------------------------------|
|                                            |                           | Par litre de culture | Pour cent de saccharose transformé |
| Gaz                                        | H. . . . .                | 1135 <sup>cc</sup>   | 11350 <sup>cc</sup>                |
|                                            | CO <sup>2</sup> . . . . . | 911 <sup>cc</sup>    | 9110 <sup>cc</sup>                 |
| Acidité, en acide acétique.                | { totale . . .            | 48 <sup>gr</sup> 890 | 48 <sup>gr</sup> 90                |
|                                            | { volatile . .            | 1 308                | 13 08                              |
|                                            | { fixe . . . .            | 3 582                | 35 82                              |
| Acides volatils                            | { formique . . . . .      | 0 480                | 4 80                               |
|                                            | { acétique . . . . .      | 0 545                | 5 45                               |
|                                            | { caprylique . . . . .    | 0 163                | 1 63                               |
| Acides fixes                               | { lactique . . . . .      | 2 719                | 27 19                              |
|                                            | { succinique . . . . .    | 1 802                | 18 02                              |
| Alcool éthylique . . . . .                 |                           | 2 280                | 22 80                              |

### RENDEMENT

|                                    |                             |       |                      |       |
|------------------------------------|-----------------------------|-------|----------------------|-------|
| Gaz                                | { H . . . . .               | 1.01  | }                    | 18.96 |
|                                    | { CO <sup>2</sup> . . . . . | 17.95 |                      |       |
| Acides volatils                    | { formique . . .            | 4.80  | }                    | 11.88 |
|                                    | { acétique . . .            | 5.45  |                      |       |
|                                    | { caprylique . .            | 1.63  |                      |       |
| Acides fixes                       | { lactique . . .            | 27.19 | }                    | 45.21 |
|                                    | { succinique . .            | 18.02 |                      |       |
| Alcool éthylique . . . . .         |                             | 22.80 |                      | 22.80 |
| Total des produits dosés . . . . . |                             | 98.85 | p. 100 de saccharose |       |

### Fermentation du Lactose

EN MILIEU MINÉRAL SANS CARBONATE DE CHAUX

Le milieu minéral de composition suivante :

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| Sulfate d'ammoniaque . . . . . | 4 gr. 70  |
| Phosphate monopotassique . . . | 0 gr. 75  |
| Sulfate de magnésie . . . . .  | 0 gr. 10  |
| Lactose . . . . .              | 10 gr.    |
| Eau . . . . .                  | Un litre. |

a été stérilisé à 120°, puis abandonné au refroidissement et ensemencé avec l'espèce pure : la fermentation a été conduite comme les précédentes et parallèlement avec celle du saccharose.

Elle a donné les résultats suivants rapportés à un litre de culture, c'est-à-dire à dix grammes de lactose mis en expérience.

#### ANALYSE DES GAZ

*Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures et gaz dissous, par litre de culture :*

|                                        | Volume            | CO <sup>2</sup>   | H                 |
|----------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 <sup>er</sup> fractionnement.....    | 38 <sup>cc</sup>  | 5 <sup>cc</sup>   | 33 <sup>cc</sup>  |
| 2 <sup>e</sup> — .....                 | 85                | 10                | 75                |
| 3 <sup>e</sup> — .....                 | 58                | 12                | 46                |
| 4 <sup>e</sup> — (durée: 4 jours)..... | 44                | 12                | 32                |
| Total des gaz dégagés .....            | 225 <sup>cc</sup> | 39 <sup>cc</sup>  | 186 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous.....                       | 151 <sup>cc</sup> | 136 <sup>cc</sup> | 15 <sup>cc</sup>  |
| Gaz engendrés, par litre de culture    | 376 <sup>cc</sup> | 175 <sup>cc</sup> | 201 <sup>cc</sup> |

#### ANALYSE DU LIQUIDE

*Proportion de lactose consommé.* — 18.30 pour cent.

*ACIDITÉ TOTALE.* — Elle équivaut à 0 gr. 68 d'acide acétique par litre de culture.

#### RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

Lactose transformé, pour cent..... 18.30

|                                         |                         | Par litre<br>de culture | Pour cent<br>de lactose<br>transformé |
|-----------------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| Gaz                                     | { H .....               | 201 <sup>cc</sup>       | 10982 <sup>cc</sup>                   |
|                                         | { CO <sup>2</sup> ..... | 175 <sup>cc</sup>       | 9562 <sup>cc</sup>                    |
| Acidité totale, en acide acétique. .... |                         | 0gr.68                  | 37gr.15                               |

#### Fermentation du Lactose

##### EN MILIEU MINÉRAL EN PRÉSENCE DE CARBONATÉ DE CHAUX

Le milieu de culture précédent additionné de dix grammes de carbonate de chaux pur par litre a été stérilisé puis ensemencé avec l'espèce pure.

La fermentation a donné les résultats suivants rapportés à un litre de culture, c'est-à-dire à dix grammes de lactose.



# ANALYSE DES GAZ

*Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures et gaz dissous, par litre de culture :*

|                                     | Volume             | CO <sup>2</sup>    | H                  |
|-------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 <sup>er</sup> fractionnement..... | 400 <sup>cc</sup>  | 190 <sup>cc</sup>  | 210 <sup>cc</sup>  |
| 2 <sup>e</sup> — .....              | 430                | 213                | 217                |
| 3 <sup>e</sup> — .....              | 452                | 225                | 227                |
| 4 <sup>e</sup> — .....              | 450                | 235                | 215                |
| 5 <sup>e</sup> — .....              | 446                | 290                | 156                |
| 6 <sup>e</sup> — .....              | 315                | 230                | 85                 |
| 7 <sup>e</sup> — (durée: 4 jours)   | 140                | 107                | 33                 |
| Total des gaz dégagés .....         | 2633 <sup>cc</sup> | 1490 <sup>cc</sup> | 1143 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous.....                    | 459 <sup>cc</sup>  | 446 <sup>cc</sup>  | 13 <sup>cc</sup>   |
| Gaz engendrés, par litre de culture | 3092 <sup>cc</sup> | 1936 <sup>cc</sup> | 1156 <sup>cc</sup> |

*Acide carbonique provenant du carbonate de chaux.* — La quantité de carbonate de chaux dissous est égale à 5 gr. 08 : en retranchant de ce nombre la fraction de 0 gr. 27 représentant la proportion de cette substance décomposée par l'acidité phosphorique du milieu de culture, il en reste une quantité de 4 gr. 81 dissoute par les acides engendrés, à laquelle correspond un volume de 1072<sup>cc</sup> d'anhydride carbonique à déduire du volume total mesuré de ce gaz.

En définitive, le dégagement gazeux dans cette fermentation du lactose est constitué par :

$$\text{CO}^2 = 864^{\text{cc}} \qquad \text{H} = 1156^{\text{cc}}$$

## ANALYSE DU LIQUIDE

Comme dans les fermentations précédentes, le liquide présente une légère odeur sudorale reconnaissable surtout à la distillation, une saveur fade de liquide fermenté ; sa réaction est neutre à l'orangé et il colore le tournesol en rouge vineux : il ne réduit pas la liqueur de Fehling.

*Proportion de lactose consommé : 100 pour 100.*

### Séparation des acides volatils et des acides fixes

Le liquide de fermentation provenant de un litre de culture est séparé du dépôt de carbonate et de phosphate de chaux que l'on épuise ensuite par l'eau bouillante. Au volume total de ce liquide et des eaux de lavage on ajoute une dissolution de 6 gr. 5 d'acide oxalique cristallisé, quantité suffisante pour libérer complètement les acides de leurs combinaisons avec la chaux, la potasse et l'ammoniaque ; puis on procède à l'extraction des acides volatils comme dans les fermentations précédentes.

# ACIDITÉ VOLATILE

Le liquide de distillation résultant de l'isolement des acides volatils est encore trouble, opalescent, comme les liquides analogues fournis par les substances fermentescibles déjà examinées. L'analyse quantitative de ce distillatum révèle également la présence des acides *formique* et *acétique*, ainsi que l'existence en minime quantité d'au moins un acide volatil insoluble ou peu soluble dans l'eau ; acidité volatile insoluble vraisemblablement constituée en majeure partie par de l'acide *caprylique*, en raison des caractères déjà mentionnés. Ce liquide contient aussi de l'alcool éthylique.

## Acidité volatile insoluble.

Elle équivaut à 0 gr. 077 d'acide acétique, par litre de culture, soit à  $0\text{ gr. }077 \times 2.4 = 0\text{ gr. }185$  d'acide caprylique.

## Acidité volatile soluble.

Elle est représentée par les acides formique, acétique, et par une trace d'acide supérieur très peu soluble dans l'eau.

*Acidité totale.* — L'acidité de ce mélange, provenant de un litre de culture, équivaut à 1 gr. 58 d'acide acétique.

ACIDE FORMIQUE. — 0 gr. 62 par litre de culture.

ACIDE ACÉTIQUE. — Cet acide a été évalué après élimination de l'acide formique, et par deux méthodes différentes.

a) *Dosage par acidimétrie.* — 0 gr. 674 d'acide acétique par litre de culture.

b) *Dosage par la méthode de Duclaux.*

| Fractionnements<br>successifs de 10cc | Eau de chaux       | Fractionnements<br>totalisés | Eau de chaux       |
|---------------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|
| 1 <sup>er</sup>                       | 14 <sup>cc</sup> 6 | 10 premiers cmc.             | 14 <sup>cc</sup> 6 |
| 2 <sup>e</sup>                        | 15. 6              | 20 —                         | 30. 2              |
| 3 <sup>e</sup>                        | 15. 9              | 30 —                         | 46. 1              |
| 4 <sup>e</sup>                        | 16. 2              | 40 —                         | 62. 3              |
| 5 <sup>e</sup>                        | 17                 | 50 —                         | 79. 3              |
| 6 <sup>e</sup>                        | 18. 1              | 60 —                         | 97. 4              |
| 7 <sup>e</sup>                        | 19. 2              | 70 —                         | 116. 6             |
| 8 <sup>e</sup>                        | 20. 9              | 80 —                         | 137. 5             |
| 9 <sup>e</sup>                        | 22. 9              | 90 —                         | 160. 4             |
| 10 <sup>e</sup>                       | 27                 | 100 —                        | 187. 4             |

On reconnaît encore l'irrégularité dans l'accroissement des quantités d'eau de chaux saturantes, et due à la présence de traces d'acide supérieur.

L'eau de chaux employée étant telle que un centimètre cube sature 0. gr. 0028 d'acide acétique, cette équivalence permet d'évaluer la quantité de cet acide contenue dans les cent premiers centimètres cubes, par l'égalité :

$$187.4 \times 0.0028 = 0.5247$$

soit pour la totalité de l'acide acétique du liquide soumis à la distillation et provenant de un litre de culture :

$$\frac{0.5247 \times 100}{80} = 0.656$$

Moyenne des deux résultats : 0 gr. 665 d'acide acétique par litre du liquide de fermentation.

Acidité *volatile soluble* totale, en acide acétique :

|                   |                    |                       |       |
|-------------------|--------------------|-----------------------|-------|
| Acidité formique, | en acide acétique, | $0.62 \times 1.304 =$ | 0.808 |
| — acétique        | —                  |                       | 0.665 |
| Trouvé :          |                    | Calculé :             | 1.473 |

Acidité *volatile* totale (soluble et insoluble), en acide acétique, par litre de culture.

$$1.58 + 0.077 = 1.657$$

#### ACIDITÉ FIXE

L'analyse qualitative de la liqueur qui reste après la séparation des acides volatils révèle la présence des acides *lactique* et *succinique* : elle contient en outre une minime quantité d'acide oxalique ajouté en léger excès pour la libération des acides de leurs combinaisons calciques ou salines en général. L'acide lactique formé est constitué par un mélange de ses représentants inactif et gauche.

L'analyse quantitative a été effectuée sur le dixième du volume de cette liqueur résiduelle, suivant la méthode exposée.

#### Dosage de l'acide succinique.

Poids du succinate et de l'oxalate de baryte : 0.3777.

*Évaluation de l'oxalate de baryte.* — Il faut employer 3<sup>cc</sup>6 de solution de permanganate de potasse titrée à 2 gr. pour un litre,

soit  $3.6 \times 0.002 = 0.0072$  de permanganate,  
 ce qui correspond à  $2 \times 0.0072 = 0.0144$  d'acide oxalique cristallisé  
 ou à  $\frac{234}{126} \times 0.0144 = 0.0266$  d'oxalate de baryte  
 ( $C^2O^4 Ba, 1/2 H^2O$ ).

Calcul de l'acide succinique :

Succinate de baryte :  $0.3777 - 0.0266 = 0.3511$   
 Acide succinique :  $0.3511 \times 0.4664 = 0.1637$

soit 1 gr. 637 d'acide succinique par litre de culture.

Acidité *acétique* équivalente :  $1.637 \times 1.016 = 1.663$ .

**Dosage de l'acide lactique.**

Poids du lactate de baryte anhydre :  $0.412$

*Transformation du lactate de baryte en sulfate de baryte :*

|                              |          |          |
|------------------------------|----------|----------|
|                              | Trouvé   | Calculé  |
| Poids du sulfate de baryte : | $0.3110$ | $0.3047$ |

Calcul de l'acide lactique :

Au moyen du lactate de baryte :  $0.412 \times 0.5714 = 0.2354$   
 — du sulfate de baryte :  $0.311 \times 0.7725 = 0.2402$

soit, en moyenne, une quantité de 2 gr. 378 d'acide lactique par litre du liquide fermenté.

Acidité *acétique* équivalente :  $2.378 \times 0.644 = 1.531$

Acidité *fixe*, en acide acétique, par litre de culture :

$1.663 + 1.531 = 3.194$

ACIDITÉ TOTALE (volatile et fixe), en acide acétique, par litre de culture :

$1.657 + 3.194 = 4.851$

D'après la quantité de carbonate de chaux dissoute par les acides engendrés et égale à 4 gr. 81, l'acidité totale serait équivalente à 5 gr. 72 d'acide acétique. Comme dans les fermentations précédentes, la différence entre ces nombres exprimant les acidités dosée et calculée, est encore due à l'acidité volatile carbonique qui contribue, elle aussi, et pour une part importante à la dissolution du carbonate de chaux.



## Recherche et dosage des alcools.

L'étude du fractionnement de distillation mis à part dans l'opération de la séparation des acides volatils, en vue de la recherche des représentants de la fonction alcool, révèle la présence de l'alcool éthylique.

La proportion moyenne a été évaluée à 2 gr. 25 par litre de culture.

### RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

| Lactose transformé, pour cent ..... |                         | 100                   |                                 |
|-------------------------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------------------|
|                                     |                         | Par litre de culture  | Pour cent de lactose transformé |
| Gaz                                 | { H. ....               | 1156 <sup>cc</sup>    | 11560 <sup>cc</sup>             |
|                                     | { CO <sup>2</sup> ..... | 864 <sup>cc</sup>     | 8640 <sup>cc</sup>              |
| Acidité, en acide acétique          | { totale ..             | 48 <sup>gr</sup> .851 | 48 <sup>gr</sup> .51            |
|                                     | { volatile..            | 1 657                 | 16 57                           |
|                                     | { fixe.....             | 3 194                 | 31 94                           |
| Acides volatils                     | { formique.....         | 0 620                 | 6 20                            |
|                                     | { acétique.....         | 0 665                 | 6 65                            |
|                                     | { caprylique .....      | 0 185                 | 1 85                            |
| Acides fixes...                     | { lactique.....         | 2 378                 | 23 78                           |
|                                     | { succinique .....      | 1 637                 | 16 37                           |
| Alcool éthylique .....              |                         | 2 250                 | 22 50                           |

### RENDEMENT

|                               |                         |       |   |                         |
|-------------------------------|-------------------------|-------|---|-------------------------|
| Gaz                           | { H. ....               | 1.13  | } | 18.15                   |
|                               | { CO <sup>2</sup> ..... | 17 02 |   |                         |
| Acides volatils               | { formique..            | 6 20  | } | 14.70                   |
|                               | { acétique...           | 6.65  |   |                         |
|                               | { caprylique            | 1.85  |   |                         |
| Acides fixes...               | { lactique...           | 23.78 | } | 40.15                   |
|                               | { succinique.           | 16.37 |   |                         |
| Alcool éthylique .....        |                         | 22.50 |   | 22.50                   |
| Total des produits dosés..... |                         |       |   | 95.50 p. 100 de lactose |

## Fermentation du Maltose

EN MILIEU MINÉRAL SANS CARBONATE DE CHAUX

L'opération a été effectuée en même temps que celle du saccharose et du lactose et avec un ferment identique provenant d'une même culture.

Il est à remarquer que, parmi les substances qu'il est capable de transformer, le maltose paraît être un aliment de choix pour le bacille ; dans le milieu minéral de composition suivante :

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| Sulfate d'ammoniaque .....     | 4 gr. 70  |
| Phosphate monopotassique... .. | 0 gr. 75  |
| Sulfate de magnésie .. .. .    | 0 gr. 10  |
| Maltose .....                  | 10 gr.    |
| Eau .....                      | Un litre. |

la culture se développe très rapidement et la fermentation s'effectue également en un temps relativement court.

#### ANALYSE DES GAZ

*Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures, et gaz dissous, par litre de culture :*

|                                        | Volume            | CO <sup>2</sup>   | H                 |
|----------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 <sup>er</sup> fractionnement .. .. . | 55 <sup>cc</sup>  | 5 <sup>cc</sup>   | 50 <sup>cc</sup>  |
| 2 <sup>e</sup> — .. .. .               | 94                | 11                | 83                |
| 3 <sup>e</sup> — .. .. .               | 79                | 10                | 69                |
| 4 <sup>e</sup> — (durée : 1 jour) ..   | 14                | 3                 | 11                |
| Total des gaz dégagés.....             | 242 <sup>cc</sup> | 29 <sup>cc</sup>  | 213 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous.....                       | 143 <sup>cc</sup> | 130 <sup>cc</sup> | 13 <sup>cc</sup>  |
| Gaz engendrés, par litre de culture.   | 385 <sup>cc</sup> | 159 <sup>cc</sup> | 226 <sup>cc</sup> |

#### ANALYSE DU LIQUIDE

*Proportion de maltose consommé : 18.75 pour 100.*

ACIDITÉ TOTALE. — Elle équivaut à 0 gr. 81 d'acide acétique par litre de culture.

#### RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

Maltose transformé, pour cent .....

18 75

|                                        | Par litre de culture | Pour cent de maltose transformé |
|----------------------------------------|----------------------|---------------------------------|
| Gaz { H.....                           | 226 <sup>cc</sup>    | 12052 <sup>cc</sup>             |
| CO <sup>2</sup> .....                  | 159 <sup>cc</sup>    | 8479 <sup>cc</sup>              |
| Acidité totale, en acide acétique .... | 0gr.81               | 43gr.19                         |

## Fermentation du Maltose

EN MILIEU MINÉRAL EN PRÉSENCE DE CARBONATE DE CHAUX

Le milieu de culture précédent, additionné de 10 grammes de carbonate de chaux pur par litre, a été stérilisé, puis ensemencé avec l'espèce pure.

La fermentation a donné les résultats suivants rapportés à un litre de culture, c'est-à-dire à 10 grammes de maltose.

### ANALYSE DES GAZ

*Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures, et gaz dissous, par litre de culture :*

|                                         | Volume             | CO <sup>2</sup>    | H                  |
|-----------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 <sup>re</sup> fractionnement.....     | 452 <sup>cc</sup>  | 190 <sup>cc</sup>  | 262 <sup>cc</sup>  |
| 2 <sup>e</sup> — .....                  | 460                | 228                | 232                |
| 3 <sup>e</sup> — .....                  | 453                | 251                | 202                |
| 4 <sup>e</sup> — .....                  | 455                | 262                | 193                |
| 5 <sup>e</sup> — .....                  | 431                | 260                | 171                |
| 6 <sup>e</sup> — .....                  | 320                | 218                | 102                |
| 7 <sup>e</sup> — (durée : 2 jours)..... | 88                 | 68                 | 20                 |
| Total des gaz dégagés.....              | 2659 <sup>cc</sup> | 1477 <sup>cc</sup> | 1182 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous.....                        | 454 <sup>cc</sup>  | 442 <sup>cc</sup>  | 12 <sup>cc</sup>   |
| Gaz engendrés, par litre de culture.    | 3113 <sup>cc</sup> | 1919 <sup>cc</sup> | 1194 <sup>cc</sup> |

*Acide carbonique provenant du carbonate de chaux.* — La quantité de carbonate de chaux dissous est égale à 58<sup>r</sup>.33 : en retranchant de ce nombre la fraction de 08<sup>r</sup>.27, représentant la proportion de cette substance décomposée par l'acidité phosphorique du milieu de culture, il en résulte une quantité de 58<sup>r</sup>.06 dissoute par les acides engendrés, à laquelle correspond un volume de 1128<sup>cc</sup> d'anhydride carbonique à déduire du volume total mesuré de ce gaz.

En définitive, le dégagement gazeux dans cette fermentation du maltose est constitué par :

$$\text{CO}^2 = 791^{\text{cc}} \qquad \text{H} = 1194^{\text{cc}}$$

### ANALYSE DU LIQUIDE

Il présente les caractères organoleptiques déjà mentionnés dans l'étude des fermentations précédentes, sans odeur butyrique ni saveur amère ; sa réaction est neutre à l'orangé et il colore le tournesol en rouge vineux ; vis-à-vis de la liqueur de Fehling, il possède encore un très faible pouvoir

réducteur, bien que la fermentation paraisse terminée ; ce caractère de réduction persistante, que nous avons déjà signalé à propos du galactose, ne s'observe pas avec les autres sucres : comme pour ce dernier, nous allons l'attribuer à du maltose non transformé.

*Proportion de maltose consommé : 99.2 pour 100.*

#### Séparation des acides volatils et des acides fixes.

Le liquide de fermentation provenant de un litre de culture est séparé du dépôt de carbonate et de phosphate de chaux que l'on épuise ensuite par l'eau bouillante. Au volume total de ce liquide et des eaux de lavage, on ajoute une solution de 6 gr. 7 d'acide oxalique cristallisé : puis on procède à l'extraction des acides volatils comme dans les fermentations précédentes.

#### ACIDITÉ VOLATILE

Le liquide de distillation résultant de l'extraction des acides volatils présente encore un aspect légèrement laiteux, opalescent : il contient les acides *formique* et *acétique*, ainsi qu'une minime quantité d'un acide volatil insoluble ou peu soluble dans l'eau, vraisemblablement constitué par de l'acide *caprylique* et que nous considérerons comme tel, en raison de ses caractères très voisins de ceux de cet acide et déjà mentionnés dans l'étude de la fermentation de la glycérine. Ce distillatum renferme aussi de l'alcool éthylique.

#### Acidité volatile insoluble.

Elle équivaut à 0 gr. 052 d'acide acétique par litre de culture, soit à  $0 \text{ gr. } 052 \times 2.4 = 0 \text{ gr. } 125$  d'acide caprylique.

#### Acidité volatile soluble.

Elle est représentée par les acides formique, acétique et par une trace d'acide supérieur très peu soluble dans l'eau.

*Acidité totale.* — L'acidité de ce mélange provenant de un litre de culture équivaut à 1 gr. 26 d'acide acétique.

ACIDE FORMIQUE. — 0 gr. 44 par litre du liquide de fermentation.

ACIDE ACÉTIQUE. — Cet acide a été évalué après destruction de l'acide formique, et par deux méthodes.

a) *Dosage par acidimétrie.* — 0 gr. 589 d'acide acétique par litre de culture.

b) *Dosage par la méthode de Duclaux :*

| Fractionnements.<br>successifs de 10 cc. | Eau de chaux       | Fractionnements<br>totalisés | Eau de chaux       |
|------------------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|
| 1 <sup>er</sup>                          | 12 <sup>cc</sup> 3 | 10 premiers cmc.             | 12 <sup>cc</sup> 3 |
| 2 <sup>e</sup>                           | 13. 2              | 20 —                         | 25. 5              |
| 3 <sup>e</sup>                           | 13. 5              | 30 —                         | 39. 0              |
| 4 <sup>e</sup>                           | 14                 | 40 —                         | 53. 0              |
| 5 <sup>e</sup>                           | 14. 6              | 50 —                         | 67. 6              |
| 6 <sup>e</sup>                           | 15. 8              | 60 —                         | 83. 4              |
| 7 <sup>e</sup>                           | 16. 8              | 70 —                         | 100. 2             |
| 8 <sup>e</sup>                           | 18. 6              | 80 —                         | 118. 8             |
| 9 <sup>e</sup>                           | 20. 8              | 90 —                         | 139. 6             |
| 10 <sup>e</sup>                          | 24 7               | 100 —                        | 164. 3             |

Dans le tableau de ces nombres on remarque encore une irrégularité dans l'accroissement des quantités d'eau de chaux saturantes; accroissement qui passe par un minimum entre le deuxième et le troisième terme : irrégularité due à la présence d'acide supérieur.

L'eau de chaux employée étant telle que un centimètre cube sature 0 gr. 0028 d'acide acétique, cette équivalence permet d'évaluer la quantité de cet acide contenue dans les cent premiers centimètres cubes par l'égalité :

$$164.3 \times 0^{\text{gr}}.0028 = 0^{\text{gr}}.460$$

soit pour la totalité de l'acide acétique du liquide soumis à la distillation et provenant de un litre de culture :

$$\frac{0^{\text{gr}}.460 \times 100}{80} = 0^{\text{gr}}.575$$

Moyenne des deux résultats : 0 gr. 582 d'acide acétique, par litre de culture.

Acidité *volatile* soluble totale, en acide acétique :

|                                      |                                                     |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Acidité formique, en acide acétique, | $0^{\text{gr}}.44 \times 1.304 = 0^{\text{gr}}.574$ |
| — acétique, —                        | $0^{\text{gr}}.582$                                 |
| Trouvé : 1 <sup>gr</sup> .26         | Calculé : 1 <sup>gr</sup> .156                      |

Acidité *volatile* totale (soluble et insoluble), en acide acétique, par litre de culture :

$$1^{\text{gr}}.26 + 0^{\text{gr}}.052 = 1^{\text{gr}}.312$$



# ACIDITÉ FIXE

Comme dans les exemples précédents, l'analyse qualitative de la liqueur qui reste après l'extraction des acides volatils montre qu'elle renferme les acides *lactique* et *succinique* : elle contient en outre une trace d'acide oxalique ajouté en excès.

L'analyse quantitative a été effectuée sur le dixième de son volume, suivant la méthode exposée.

## Dosage de l'acide succinique.

Poids du succinate et de l'oxalate de baryte : 0<sup>gr</sup>.5672

*Evaluation de l'oxalate de baryte.* — Il faut employer 4<sup>cc</sup>4 de solution de permanganate de potasse titrée à 2 gr. par litre,

soit  $4.4 \times 0^{\text{gr}}.002 = 0^{\text{gr}}.0088$  de permanganate,  
ce qui correspond à  $2 \times 0^{\text{gr}}.0088 = 0^{\text{gr}}.0176$  d'acide oxalique cristallisé  
ou à  $\frac{234}{126} \times 0^{\text{gr}}.0176 = 0^{\text{gr}}.0325$  d'oxalate de baryte  
(C<sup>2</sup>O<sup>4</sup> Ba, 1/2 H<sup>2</sup>O).

Calcul de l'acide succinique :

Succinate de baryte :  $0^{\text{gr}}.5672 - 0^{\text{gr}}.0325 = 0^{\text{gr}}.5347$   
Acide succinique :  $0^{\text{gr}}.5347 \times 0.4664 = 0^{\text{gr}}.2494$

soit 2 gr. 494 d'acide succinique par litre de culture.

Acidité *acétique* équivalente,  $2^{\text{gr}}.494 \times 1.016 = 2^{\text{gr}}.534$

## Dosage de l'acide lactique.

Poids du lactate de baryte anhydre : 0<sup>gr</sup>.4000

*Transformation du lactate de baryte en sulfate de baryte :*

|                              | Trouvé                | Calculé               |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Poids du sulfate de baryte : | 0 <sup>gr</sup> .2968 | 0 <sup>gr</sup> .2958 |

Calcul de l'acide lactique :

Au moyen du lactate de baryte :  $0^{\text{gr}}.4000 \times 0.5714 = 0^{\text{gr}}.2285$   
— sulfate de baryte :  $0^{\text{gr}}.2968 \times 0.7725 = 0^{\text{gr}}.2292$

soit, en moyenne, une quantité de 2 gr. 288 d'acide lactique par litre du liquide fermenté.

Acidité *acétique* équivalente :  $2^{\text{gr}}.288 \times 0.644 = 1^{\text{gr}}.473$

Acidité *fixe*, en acide acétique, par litre de culture :

$$28^{\text{gr}}.534 + 18^{\text{gr}}.473 = 47^{\text{gr}}.007$$

ACIDITÉ TOTALE (volatile et fixe), en acide acétique, par litre de culture :

$$18^{\text{gr}}.312 + 47^{\text{gr}}.007 = 55^{\text{gr}}.319$$

D'après la quantité de carbonate de chaux dissoute par les acides engendrés et égale à 5 gr. 06, l'acidité totale serait équivalente à 6 gr. 072 d'acide acétique : la différence entre ces nombres exprimant les acidités dosée et calculée est due à l'acidité volatile carbonique non évaluée et qui contribue pour une part importante à dissoudre le carbonate de chaux.

Si, en effet, on se reporte au volume des gaz dissous, comprenant 442<sup>cc</sup> de gaz carbonique, le calcul montre que l'action dissolvante de cette masse gazeuse équivaldrait à celle de 2 gr. 38 d'acide acétique, si sa totalité était employée à la dissolution du carbonate de chaux.

#### Recherche et dosage des alcools.

L'étude du fractionnement de distillation mis à part dans l'opération de l'extraction des acides volatils, en vue de la recherche des représentants de la fonction alcool, révèle la présence de l'alcool *éthylrique*.

Sa proportion moyenne a été évaluée à 2 gr. par litre du liquide de fermentation.

#### RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

|                                    |                      |                       |                                 |
|------------------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------------|
| Maltose transformé, pour cent..... |                      | 99.2                  |                                 |
|                                    | Par litre de culture |                       | Pour cent de maltose transformé |
| Gaz {                              | H ..                 | 1194 <sup>cc</sup>    | 12035 <sup>cc</sup>             |
|                                    | CO <sup>2</sup> ..   | 791 <sup>cc</sup>     | 7973 <sup>cc</sup>              |
| Acidité, en acide acétique {       | totale ...           | 55 <sup>gr</sup> .319 | 53 <sup>gr</sup> .61            |
|                                    | volatile..           | 1 312                 | 13 22                           |
|                                    | fixe .....           | 4 007                 | 40. 39                          |
| Acides volatils {                  | formique.....        | 0 44                  | 4 43                            |
|                                    | acétique....         | 0 582                 | 5 86                            |
|                                    | caprylique.....      | 0 125                 | 1 26                            |
| Acides fixes.... {                 | lactique.....        | 2 288                 | 23 06                           |
|                                    | succinique .....     | 2 494                 | 25 14                           |
| Alcool éthylrique .....            |                      | 2                     | 20 16                           |

RENDEMENT

|                               |   |                       |       |   |                          |
|-------------------------------|---|-----------------------|-------|---|--------------------------|
| Gaz                           | { | H.....                | 1.97  | } | 16.65                    |
|                               |   | CO <sup>2</sup> ..... | 15.58 |   |                          |
| Acides volatils               | { | formique..            | 4.43  | } | 11.55                    |
|                               |   | acétique...           | 5.86  |   |                          |
|                               |   | caprylique            | 1.26  |   |                          |
| Acides fixes...               | { | lactique...           | 23.06 | } | 48.20                    |
|                               |   | succinique            | 25.14 |   |                          |
| Alcool éthylique .....        |   |                       | 20.16 |   | 20.16                    |
| Total des produits dosés..... |   |                       |       |   | 96.56 p. 100 de maltose. |

Formules chimiques de la production des différents corps  
dans cette fermentation des Saccharoses.

a) *Production des acides volatils.* — ACIDE FORMIQUE. — Comme dans les fermentations de la mannite et des hexoses, cet acide doit être engendré dans une combustion intérieure de la molécule sucrée, effectuée au moyen de l'oxygène de l'eau, suivant la formule :

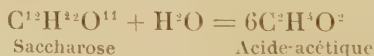


Cette formation synthétique de l'acide formique peut aussi être indirecte et accompagner la production de l'alcool éthylique dans la fermentation de la matière sucrée après hydrolyse et hydrogénation préalables, suivant la réaction :



Ces formations peuvent être suivies d'une décomposition partielle de l'acide formique en ses constituants gazeux.

ACIDE ACÉTIQUE. — On peut attribuer à la production de l'acide acétique deux formules directrices : l'une,



qui traduit une hydrolyse suivie d'une dépolymérisation de la molécule sucrée et qui ne comporte aucun dégagement gazeux ; l'autre,

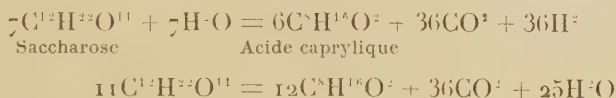


qui correspond à la combustion incomplète du sucre aux dépens de l'oxygène de l'eau et qui s'effectue avec un dégagement de gaz hydrogène et carbonique. En même temps que l'hydrogène de l'eau se dégage, son oxygène accomplit une véritable *combustion intérieure* dont l'acide acétique et l'acide carbonique sont les produits.

En admettant cette hypothèse bien vraisemblable et nécessaire

pour l'harmonie des résultats, nous retrouvons encore ici cet exemple d'un fait assez curieux, savoir la décomposition de l'eau par un ferment avec emprunt de son oxygène pour produire une action comburante. Nous en déduisons en outre cette conclusion aussi intéressante : comme l'acide acétique est moins oxygéné que l'eau et plus complexe, il en résulte que, si, au regard du sucre pris pour origine de son carbone, il représente un produit d'analyse, à l'égard de l'eau considérée comme source de son oxygène, il constitue un produit de synthèse.

ACIDE CAPRYLIQUE. — En supposant que cet acide soit le représentant principal de l'acidité volatile insoluble, les réactions suivantes s'accomplissant avec ou sans dégagement d'hydrogène rendent compte de sa formation :

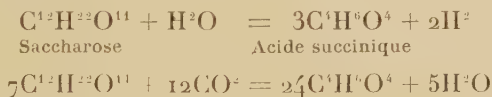


b) *Production des acides fixes.* — ACIDE LACTIQUE. — La production de cet acide aux dépens d'un saccharose est représentée par la réaction classique :



qui traduit encore une dépolymérisation de la molécule sucrée précédée de son hydrolyse.

ACIDE SUCCINIQUE. — On peut attribuer à la formation de l'acide succinique l'une des deux formules suivantes :



c) *Production de l'alcool éthylique.* — Elle s'accomplit suivant la formule classique de la fermentation alcoolique à partir d'un saccharose :



L'alcool peut aussi naître en partie, conjointement avec l'acide formique, suivant la réaction (2) transcrite plus haut, et ramenant cette transformation alcoolique du saccharose à une fermentation de mannite.

Cette hypothèse, que nous avons déjà envisagée et développée à propos de la fermentation des hexoses, permet d'équilibrer la quantité d'alcool trouvée avec celle d'acide carbonique dégagé. La production d'alcool suivant la réaction (3) est accompagnée d'un dégagement abondant de gaz carbonique (environ 500<sup>cc</sup> de CO<sup>2</sup> pour 1 gramme d'alcool). Or, si celle-ci s'accomplissait uniquement suivant cette formule, le volume d'acide carbonique ainsi engendré, calculé d'après

cette production, serait supérieur au volume mesuré de ce gaz que d'autres origines contribuent encore à augmenter. Il serait donc nécessaire d'admettre qu'un certain volume de l'acide carbonique se fixe sur le sucre pour former de l'acide succinique : il est aussi vraisemblable de considérer qu'il demeure uni avec de l'hydrogène à l'état d'acide formique, conformément à l'hypothèse énoncée.

En calculant d'après ces équations les volumes d'hydrogène correspondant aux quantités précédemment évaluées pour chacun des acides formés, et en totalisant les résultats obtenus, on trouve que le volume de ce gaz ainsi calculé est notablement inférieur au volume réellement dégagé et mesuré, même en ne faisant choix que des formules représentant un dégagement de ce gaz.

Il en résulte qu'une autre cause, au moins, contribue encore à la production de l'hydrogène. De même que dans les fermentations précédentes, nous devons la rapporter soit à la décomposition d'une partie de l'acide formique, soit à une combustion complète, aux dépens de l'oxygène de l'eau, du carbone d'une partie du sucre ; ce qui entraîne une double libération d'hydrogène, ce gaz venant à la fois de la substance fermentescible et de l'eau : la formule traduisant cette combustion est alors représentée par l'équation (1) ainsi modifiée :



laquelle contribue à établir l'équilibre entre les deux gaz en fournissant un volume d'hydrogène double de celui de l'acide carbonique.

En résumé, nous retrouvons encore ici, à l'état plus ou moins achevé, cette combustion intérieure de la matière fermentescible aux dépens de l'oxygène de l'eau. Les véritables ferments anaérobies possèdent ce pouvoir de décomposer l'eau ; ils ont besoin de son oxygène pour leur acte respiratoire ; ils utilisent, d'autre part, ce gaz pour faire des combustions, et, comme la source en est illimitée, ils peuvent vivre indéfiniment à l'abri de l'air : grâce à cette propriété, la puissance comburante du ferment que nous étudions, et qui est un anaérobie facultatif, se manifeste encore en l'absence d'oxygène libre.

La levure se distingue des ferments anaérobies en ce qu'elle se montre incapable d'emprunter son oxygène à l'eau : puisqu'une trace d'oxygène libre fournie à une cul-



ture inerte dans un milieu neuf et tout à fait favorable à son développement suffit pour la ranimer, cela prouve qu'elle ne pouvait pas, par ses propres moyens, tirer cet oxygène de ses aliments ou de l'eau.

*Éléments non dosés.* — Dans chacun des écarts à cent fournis par les rendements de fermentation des saccharoses soumis à notre étude doivent figurer les éléments de la substance sucrée qui sont immobilisés pour former le corps des microbes et ceux qui entrent dans les déchets de leur vie.

Dans l'estimation de ces rendements, il convient de remarquer que pour équilibrer le compte des éléments dosés, gaz, acides, alcool, nous avons dû recourir à une réaction avec décomposition de l'eau, laquelle fournit à l'évaluation pondérale des produits obtenus une minime quantité d'hydrogène et d'oxygène non pesés au départ.

Enfin, et comme terme de correction de signe contraire au précédent, nous devons aussi mentionner la petite quantité d'eau pouvant être libérée d'un saccharose dans la formation de l'acide caprylique et de l'acide succinique.

TABLEAU COMPARATIF DES RÉSULTATS DE FERMENTATION  
DE LA GLYCÉRINE, DE LA MANNITE, DES HEXOSES ET SACCHAROSES  
POUR CENT PARTIES DE SUBSTANCES

|                              |                      | Glycérine | Mannite | Glucose | Lévéulose | Gaïactose | Saccharose | Lactose | Maltose |
|------------------------------|----------------------|-----------|---------|---------|-----------|-----------|------------|---------|---------|
| Gaz                          | { hydrogène.....     | 0.85      | 1.73    | 0.98    | 1.21      | 1.04      | 1.01       | 1.13    | 1.07    |
|                              | { acide carbonique   | 12        | 24.53   | 18.77   | 18.40     | 16.57     | 17.95      | 17.02   | 15.58   |
| Acidité<br>acétique          | { totale.....        | 40.46     | 45.75   | 50.12   | 51.22     | 47.98     | 48.90      | 48.51   | 53.61   |
|                              | { volatile.....      | 20.31     | 14.57   | 13.51   | 14.25     | 13.68     | 13.68      | 16.57   | 13.24   |
|                              | { fixe.....          | 20.15     | 31.18   | 36.61   | 36.97     | 34.30     | 35.22      | 31.94   | 40.36   |
| Acides                       | { formique.....      | 6.90      | 5.38    | 5.90    | 5.20      | 5.58      | 4.80       | 6.20    | 4.43    |
|                              | { acétique.....      | 9.44      | 7.31    | 4.55    | 5.63      | 6.26      | 5.45       | 6.65    | 5.86    |
|                              | { caprylique.....    | 1.15      | 1.36    | 0.41    | 1.56      | 1.39      | 1.63       | 1.85    | 1.26    |
|                              | { acrylique.....     | 1.68      |         |         |           |           |            |         |         |
|                              | { lactique.....      | 15.60     | 20.13   | 29.93   | 28.12     | 27.51     | 27.19      | 23.78   | 23.06   |
|                              | { succinique.....    | 9.95      | 17.93   | 17.07   | 18.56     | 16.31     | 18.02      | 16.37   | 25.14   |
| Alcools                      | { éthylique.....     | 15.80     | 19.30   | 22      | 21        | 19.81     | 22.80      | 22.50   | 20.16   |
|                              | { triméthyléneglycol | 14.50     |         |         |           |           |            |         |         |
| Rendement en éléments dosés: |                      | 87.87     | 97.67   | 99.61   | 99.68     | 94.47     | 98.85      | 95.50   | 96.56   |

#### Comparaison et discussion des résultats:

Tous les produits de fermentation de la glycérine communs avec ceux de la mannite et des sucres : dégagement gazeux, acidité totale, alcool éthylique, sont en quantité

moindre que pour ces dernières substances, en raison des réactions supplémentaires exercées par le bacille sur cet alcool triatomique, notamment la formation de l'acroléine et de ses dérivés, ainsi que du glycol triméthylénique.

En particulier, la proportion d'hydrogène dégagé est relativement faible dans la transformation de la glycérine, bien que la richesse de cette matière en cet élément dépasse notablement celle de la mannite et surtout des sucres, et malgré le taux également moindre des substances hydrogénées résultant de cette transformation, exprimé par les chiffres de l'acidité totale et de l'alcool éthylique. Cet abaissement tient à l'action déshydratante s'effectuant sans dégagement gazeux et vraisemblablement aussi aux réactions secondaires hydrogénantes que nous avons envisagées, dont la principale est la formation du propylglycol à partir de son aldéhyde, le propanolal : de toute façon, l'existence de ce glycol, sa proportion parmi les produits de la fermentation, contribuent à immobiliser une quantité notable d'hydrogène.

Le dégagement de ce gaz atteint son maximum dans la transformation de la mannite : ce résultat de l'expérience est conforme à celui prévu par la théorie, la molécule de la mannite différant de celle d'un sucre par deux atomes d'hydrogène en plus. Dans la fermentation des sucres, la proportion d'hydrogène mis en liberté atteint son maximum pour le lévulose.

En ce qui concerne l'anhydride carbonique, c'est encore la glycérine qui fournit le rendement minimum, par suite des réactions supplémentaires précédentes, fixatrices de carbone, inexistantes pour la mannite et les sucres, et aussi en raison de la production moindre d'alcool éthylique, la formation du gaz carbonique étant principalement dépendante de la fermentation alcoolique des substances étudiées.

Cependant, le dégagement de ce gaz atteint son maximum pour la mannite, malgré une proportion d'alcool inférieure à celle formée par les sucres : vraisemblablement, pour ce corps, les réactions secondaires de fixation de l'anhydride carbonique, précédemment considérées, sont de moindre importance que pour les matières sucrées.

Les nombres qui expriment les acidités volatile et fixe dans la fermentation de la glycérine peuvent être considérés comme égaux : pour les autres substances, il est à remar-

quer que le chiffre de l'acidité fixe est notablement supérieur à celui de l'acidité volatile, le rapport étant approximativement double pour la mannite, triple pour le maltose et intermédiaire pour les autres sucres.

Malgré ses réactions complémentaires auxquelles ne participent pas la mannite et les sucres, la transformation de la glycérine fournit une acidité volatile très supérieure à celle engendrée par ces corps : cette prépondérance est due pour une part à la formation d'acide acrylique, mais elle tient principalement au rendement plus élevé des deux représentants essentiels de cette acidité, les acides formique et surtout acétique.

C'est le glucose qui fournit le moins d'acide volatil insoluble, sous forme d'acide caprylique.

Si la fermentation de la glycérine donne le maximum d'acides volatils, par contre la mannite et surtout les sucres sont grands producteurs d'acides fixes, notamment le maltose. La proportion d'acide lactique domine celle de l'acide succinique, sauf dans la transformation du maltose, où ce dernier acide est sensiblement supérieur au premier : pour la mannite, les quantités de ces deux acides sont à peu près égales ; en ce qui concerne les autres substances, il est à remarquer que le nombre qui représente l'acide succinique est sensiblement les deux tiers de celui de l'acide lactique.

Enfin, les proportions d'alcool éthylique fournies par les différents sucres sont presque égales.

#### ESSAI DE REPRODUCTION DE LA MALADIE DE L'AMERTUME DES VINS

Le *Bacillus amaracrylus*, originaire d'un vin dans lequel il s'est multiplié en le modifiant chimiquement et organoleptiquement, doit pouvoir se développer à nouveau et produire les mêmes effets après ensemencement dans un tel liquide.

Toutefois, le vin, par son alcool, son acidité, son tannin, ses aldéhydes, ses éthers, constituant un milieu essentiellement antiseptique, cette prolifération microbienne et ses conséquences ne pourront se révéler que dans un liquide de composition favorable à la vitalité du bacille.

Ainsi que nous le rappelons par détail dans la seconde partie de ce travail, relativement à nos essais de produc-

tion de la maladie de l'amertume des vins par le bacille retiré des eaux, il faut qu'il y ait adaptation entre l'être vivant et le milieu nutritif qu'on lui destine : c'est là une condition naturelle et générale nécessaire à toute vie, à celle des infiniments petits comme des êtres supérieurs.

Après ensemencement du *Bacillus amaracrylus* dans divers échantillons de vins, soit naturels, soit modifiés par privation partielle de leur alcool ou neutralisation limitée de leur acidité, nous avons obtenu un résultat positif avec quelques-uns d'entre eux et notamment avec un vin naturel.

Tous ces liquides, primitivement sains et stérilisés, capables d'assurer la multiplication cellulaire du bacille, ont présenté au cours de leur transformation progressive par le ferment, les caractères organoleptiques, chimiques et microscopiques des vins dans lesquels se développe naturellement la maladie de l'amertume. Tous renfermaient de l'acroléine; leurs acidités, volatile et fixe, étaient augmentées; leur matière colorante a été en partie altérée et précipitée, et ils ont acquis au bout d'un temps variable, évalué en mois ou en années, suivant les conditions de leur conservation, une saveur amère plus ou moins accentuée.

L'examen microscopique du dépôt de ces vins nous a révélé la forme typique décrite par Pasteur, en filaments ou rameaux articulés, en branchages entrelacés et incrustés par place, spécialement aux articulations, de matière colorante.

---

## DEUXIÈME PARTIE

---

### Sur un ferment contenu dans les eaux, capable de déshydrater la glycérine.

---

Au cours de notre étude sur un ferment végétant dans les vins amers, transformant la *glycérine* en *acroléine*, et que, pour cette double raison d'origine et de fonction physiologique, nous avons dénommé *Bacillus amaracrylus*, nous avons reconnu qu'en ensemençant avec de l'eau de Dijon un milieu minéral glyciné, peptoné ou non, il se produisait des cultures abondantes d'un bacille présentant les caractères morphologiques de celui que nous venions d'isoler des vins amers et capable, lui aussi, de déshydrater la glycérine.

Nous avons cherché à généraliser ces résultats en appliquant cet essai à des eaux d'origines très diverses, de source, de puits, de rivière : toutes les ont confirmés. La présence dans l'eau d'un ferment figuré susceptible de transformer la glycérine en acroléine paraît donc générale.

En fait, voici dans sa simplicité, l'expérience qui montre cette déshydratation par voie biologique.

Le milieu liquide de composition suivante :

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| Sulfate d'ammoniaque..... | 4gr.70    |
| Phosphate de potasse..... | 0gr.75    |
| Sulfate de magnésie.....  | 0gr.10    |
| Peptone.....              | 5gr.      |
| Glycérine,.....           | 10gr.     |
| Eau ordinaire.....        | Un litre. |

est placé en flacon plein et bouché à l'étuve à la température de 25 à 30 degrés. Au bout de vingt-quatre heures le liquide est trouble : s'il a été préparé avec le phosphate



bipotassique, sa réaction primitivement alcaline au tournesol est devenue acide; préparé avec le phosphate monopotassique dont nous nous sommes habituellement servi, sa réaction acide s'est accentuée : il est le siège d'une effervescence constituée par un mélange des gaz hydrogène et acide carbonique; l'hydrogène se dégageant à ce moment en proportion dominante, le gaz carbonique restant dissous en majeure partie.

L'agent du phénomène provient bien de l'eau, car cette fermentation se reproduit invariablement en ensemençant le même milieu, stérile, avec de l'eau ordinaire.

Dès après cette période, tout à fait initiale, le réactif *protéique acide* agissant *directement* sur le liquide, c'est-à-dire sans concentration préalable par distillation, révèle généralement l'existence de l'acroléine. Quelquefois, l'apparition de l'aldéhyde acrylique est plus rapide ou plus tardive; mais, dans la grande majorité de nos nombreux essais, le réactif l'a toujours décelé au bout de vingt-quatre à quarante-huit heures. L'acroléine se forme aussi à température plus basse, 20°, 18° ou 15°, mais au bout d'un temps plus long; elle apparaît également à la température de 35°, mais se transforme rapidement, en sorte que sa formation peut passer inaperçue. Elle naît en milieu fortement magnésien, contenant, par exemple, dix grammes de sulfate de magnésie par litre; en milieu moins peptoné ou même purement minéral : sa production dans le vase à fermentation est toujours précédée de celle d'un autre aldéhyde, ainsi que nous l'expliquons dans ce qui suit.

Parallèlement à cette expérience, nous en avons ordinairement réalisé d'autres qui n'en sont que des variantes. Ce faisant, nous avons reconnu qu'il est souvent avantageux d'opérer avec le milieu précédemment défini, simplement minéral, c'est-à-dire sans addition de peptone. Le bacille que nous étudions pouvant se multiplier dans cette condition de moindre alimentation, l'emploi d'un tel milieu de disette permet d'éviter l'ingérence d'autres microbes, à vie plus exigeante, et dont le développement en milieu peptoné devance parfois, en le paralysant, celui du bacille recherché. Il permet en outre, grâce à sa moindre complexion et notamment à l'absence de ce corps non défini qu'est la peptone, de mieux se rendre compte de l'importance et surtout de la

réalité des métamorphoses de l'acroléine par polymérisation ou résinification, d'après la formation en plus ou moins grande quantité d'un dépôt blanc floconneux au fond du flacon renfermant le liquide fermenté.

Mieux encore, le bacille que nous étudions peut même évoluer et déshydrater la glycérine dans des milieux beaucoup moins alimentaires, en particulier ceux résultant d'une simple addition de glycérine à de l'eau ordinaire, même potable; et cela grâce à la faculté générale des microbes d'utiliser de petites quantités de substances nutritives, de l'ordre de grandeur des matières organiques et des nitrates, toujours présents dans ce liquide. La réalisation expérimentale de cette variante sera donnée au chapitre de la *glycéro-réaction*.

Enfin, en été, et si l'on n'est pas pressé, on obtient très souvent d'excellents résultats en abandonnant la culture en milieu peptoné ou en milieu minéral, à la température du laboratoire. En consultant ces liquides à l'aide du bisulfite de rosaniline, d'abord, du réactif *protéique acide*, ensuite, et lorsque la recoloration de la fuchsine accuse l'existence d'un aldéhyde, on reconnaît habituellement, au bout de quelques jours, la présence de l'acroléine, dont la proportion peut se maintenir relativement élevée pendant des semaines ou des mois, surtout en milieu minéral.

Pour tous ces essais, et lorsqu'on n'a en vue que la recherche qualitative directe de l'aldéhyde acrylique, il est commode de diminuer le volume des liquides fermentaires en opérant avec des flacons de capacité réduite, comme un quart de litre.

La présence de l'acroléine étant reconnue, le liquide rectifié à l'aide d'un tube à distillation fractionnée donne un premier fractionnement irritant pour les muqueuses nasale et surtout lacrymale exposées au voisinage de l'extrémité du réfrigérant. En raison de la facile volatilisation de l'aldéhyde acrylique, son odeur caractéristique si pénétrante se manifeste déjà avant l'entrée en ébullition du liquide et par suite avant l'écoulement dans le tube du réfrigérant des premières portions condensées. En opérant avec des liquides de fermentation donnant *directement* par le réactif *protéique acide* une teinte *verte*, accusée et ne virant pas au bleu, indice d'une teneur maxima en acroléine, l'odeur à ce début de la distillation est intolérable; le larmoiement est

intense, même lorsque l'expérience ne porte que sur un litre de culture : avec de tels liquides, l'action irritante se manifeste déjà dans les vapeurs dégagées par un volume même restreint, porté à l'ébullition.

En prenant toutes les précautions requises en pareil cas pour condenser un produit aussi volatil et aussi altérable, on peut recueillir l'acroléine dans un volume réduit de distillatum et la reconnaître à l'aide de ses autres réactions que nous avons rappelées au début de la première partie de ce travail.

A part cette réaction fournie par le réactif *protéique acide*, aucune de celles qui sont habituellement employées pour caractériser l'aldéhyde acrylique ne nous a permis d'en faire nettement la reconnaissance directe sur le liquide de fermentation, sans concentration préalable par distillation. Cet insuccès tient au manque de sensibilité pour les unes et de spécificité pour les autres : ce dernier défaut étant commun, en particulier, au bisulfite de rosaniline et au nitrate d'argent ammoniacal : c'est ainsi que le liquide fermenté recolore bien le réactif de Schiff, parfois même énergiquement, mais cette coloration ne peut qu'annoncer la présence de la fonction aldéhyde sans attribution nominale.

Au contraire, le réactif *protéique acide*, très sensible pour l'acroléine, donne en outre avec elle une réaction *distincte* de celles fournies par les nombreux aldéhydes saturés, ou comme elle, non saturés, que nous avons soumis à son action : en particulier, cette distinction existe même à l'égard de son homologue supérieur, l'aldéhyde crotonique, lequel ne donne pas la coloration bleue fournie par l'acroléine.

Toutefois, il convient de remarquer, surtout pour l'étude actuelle, que l'aldéhyde hydracrylique en solution de titre supérieur à  $\frac{1}{1000}$ , donne une réaction colorée verte analogue à celle donnée par l'acroléine pour des dilutions correspondantes ou même à un titre encore plus faible : cette coloration peut être attribuée à l'aldéhyde hydracrylique même : mais on peut aussi l'envisager comme résultant de sa transformation partielle en aldéhyde acrylique par déshydratation sous l'influence de l'acide chlorhydrique et de la température, étant donnée la relative facilité avec laquelle s'effec-

tue cette soustraction d'eau des composés hydracryliques, d'où dérive précisément leur dénomination. En solution plus diluée, cet aldéhyde fournit une coloration rose plus ou moins accentuée qu'on peut considérer comme lui appartenant en propre, puisque dans les mêmes conditions, l'acroléine en solution de titre supérieur à  $\frac{1}{5300}$  et même à dose infinitésimale donne une belle couleur bleue : pour certaines concentrations voisines du titre limite  $\frac{1}{1000}$ , on obtient une coloration mixte parfois dichroïque, rose ou rose violacé, à rellets verdâtres.

Ainsi, et indépendamment d'autres propriétés, notamment de l'odeur bien moins irritante de l'aldéhyde hydracrylique et de son point d'ébullition beaucoup plus élevé, situé à 90° sous la pression très réduite de 18<sup>m</sup>/m, tandis que l'acroléine bout à 52° sous la pression ordinaire, le réactif *protéique acide* permet encore, avec des dilutions convenables, de faire la distinction entre ces deux aldéhydes dont chacun est capable d'engendrer l'autre par les processus inverses d'hydratation et de déshydratation.

Ces propriétés attestent la supériorité évidente de ce réactif pour la reconnaissance de l'aldéhyde acrylique en général, et font que la fermentation précédente, par la facilité de sa démonstration, peut devenir l'objet d'une expérience très intéressante dans un cours ou une séance de travaux pratiques de chimie biologique.

Bien plus, ce réactif des aldéhydes permet de reconnaître dans cette fermentation deux périodes correspondant vraisemblablement aux deux phases classiques de la déshydratation de la glycérine. On admet, en effet, et on enseigne sans le démontrer expérimentalement que l'action des agents de déshydratation sur ce tri-alcool est comparable à celle qu'ils exercent sur les glycols : une première soustraction d'eau et une isomérisation conduisant au *propānolal* 1.3, aldéhyde saturé ; puis, l'action comportant une phase de plus, par suite de la présence d'une troisième fonction alcool, une deuxième soustraction d'eau transforme le *propānolal* en *acroléine*, aldéhyde non saturé ; toutes réactions déjà formulées dans ce qui précède.

En suivant la fermentation à l'aide de notre réactif de coloration des aldéhydes, on reconnaît la succession de deux phases aboutissant à la production d'aldéhydes dis-



tinets. En essayant le liquide avant qu'il puisse donner la coloration vert bleuâtre due à l'acroléine, par exemple quinze à vingt heures après la mise à l'étuve, on obtient une coloration rose qui est due à un aldéhyde, car le liquide recolore aussi le réactif de Schiff, au bisulfite de rosaniline.

La production de cet aldéhyde à partir de la glycérine, au cours d'une fermentation conduisant à la déshydratation de cette substance; sa transformation successive en acroléine ainsi qu'il paraît résulter des changements de coloration fournis par notre réactif; sa réaction colorée, sont autant de circonstances et de témoignages qui, dans l'impossibilité de son isolement en nature, et à défaut d'autres réactions caractéristiques, nous autorisent cependant à identifier ce dérivé de la glycérine avec le *propanolal 1.3* ou aldéhyde *hydracrylique*.

La même coloration se reproduit d'ailleurs à la fin de la fermentation quand celle-ci devient languissante: mais la cause en est différente et tient alors à l'incapacité du ferment, paralysé par les acides, de pouvoir réaliser la seconde phase, et la meilleure preuve en est qu'il suffit à ce moment d'ajouter du carbonate de chaux pour voir reparaitre l'acroléine quelques heures après, surtout s'il reste encore suffisamment de glycérine à transformer.

C'est encore à la production de ces deux aldéhydes qu'est due la succession de colorations observées au cours de la fermentation dans l'action du réactif sur une même prise d'essai du liquide donnant faiblement l'odeur de l'acroléine à la distillation; coloration d'abord rose, puis violacée, devenant finalement bleue.

Au bout de deux jours environ, la quantité d'aldéhyde acrylique peut atteindre 0 gr. 20 par litre, dose maxima compatible avec la vitalité du ferment dans le milieu acide qu'il s'est créé: mais l'acroléine, comme le propanolal libre ou combiné dont elle doit dériver, se transforme sans cesse dans le vase à fermentation et ses métamorphoses sont d'origine chimique et biochimique. Dans ce processus fermentatif de la glycérine, comme dans celui qu'elle subit sous l'action du ferment des vins amers, l'évolution de cette substance et de ses produits successifs de déshydratation, *propanolal* et *acroléine* est subordonnée à divers facteurs,



tels que : température, valeur nutritive et réaction du milieu, qualité et quantité du ferment, vie aérobie ou anaérobie, réactions chimiques secondaires, etc.

Lorsque toutes ces conditions s'accordent pour conférer au ferment *l'activité déshydratante maxima*, le premier aldéhyde ne subsiste pas dans le liquide, et, à part ses autres métamorphoses, il est transformé dans le second presque au fur et à mesure de sa production. Cette conclusion fondée uniquement au point de vue expérimental sur la variation des indications colorimétriques successives fournies par le réactif *protéique acide* et sur laquelle nous allons revenir, est très vraisemblable. C'est également à cette période que la distillation révèle au plus haut degré l'odeur intolérable de cet aldéhyde.

Au contraire, lorsque le ferment se présente à la glycérine avec une *activité déshydratante minima* ainsi qu'il arrive au début et à la fin de la fermentation, mais pour des causes différentes, l'aldéhyde hydracrylique, soit qu'il demeure dans le liquide, soit qu'il se transforme, notamment par hydrogénation, y domine néanmoins par rapport à l'acroléine dont la présence est cependant révélée par la nuance bleue finale de la réaction et l'épreuve organoleptique à la distillation.

Exceptionnellement, le réactif donne uniquement, même au milieu de l'opération, une teinte rose due au premier aldéhyde. Dans ce cas, ou bien le ferment est impuissant à réaliser la seconde phase de la déshydratation, ou plutôt la formation de l'acroléine est trop réduite, ses métamorphoses sont trop rapides, pour qu'elle puisse être nettement reconnue : cependant dans nombre de nos cultures, nous avons pu encore soupçonner sa présence par la nuance souvent violacée et même parfois nettement violette de la coloration, nuance résultant vraisemblablement de la fusion d'une teinte rose dominante attribuable à l'aldéhyde hydracrylique avec une pointe de bleu due à des traces infinitésimales d'acroléine.

La coloration rose ne peut être attribuée à la peptone ou à l'un de ses dérivés, car, d'une part, le même liquide de culture non glycérimé ne la reproduit pas dans des conditions comparables ; d'autre part, elle se manifeste avec une culture glycérimée purement minérale.

Il importe également de ne pas la confondre avec la réac-

tion colorée analogue que peut produire l'acide chlorhydrique nitreux agissant seul sur l'albumine dans certaines conditions que nous avons précisées (1) : cette dernière diffère de celle que donne le réactif acide sur la matière protéique en présence d'un aldéhyde, à la fois par le temps nécessaire à sa production qui est beaucoup plus long, par l'intensité de la coloration qui reste toujours faible et par la nature même de cette coloration avec les solutions faibles d'albumine : en particulier, pour cette distinction, il convient dans les essais comparatifs, de diminuer la dose d'albumine jusqu'à ce que l'épreuve à blanc des réactifs ne donne qu'une légère coloration orangée.

Les considérations précédentes relatives à l'activité déshydratante de l'espèce bactérienne dont nous avons entrepris l'étude, résultent d'observations relevées au cours de multiples fermentations à conditions expérimentales variables, tant par la pureté de la semence que par la valeur nutritive du milieu et la température.

En particulier, avec des cultures brutes du type de celle décrite plus haut et qui a servi de point de départ à ces recherches, nous avons souvent obtenu, généralement au bout de vingt-quatre à trente-six heures, par deux essais effectués à l'aide de notre réactif sur la même culture et à trois heures seulement d'intervalle, passage du *rose* au *bleu*, puis au *vert* intense. Ce changement brusque dans l'allure de la réaction chimique analytique témoigne de celui survenu dans l'action du ferment dont il jalonne en quelque sorte les phases d'activité minima et maxima. Ici, comme presque toujours, l'analyse chimique révèle le travail biologique. Elle nous montre que dans son œuvre de déshydratation, le ferment, par une demi-soustraction d'eau à la glycérine, doit élaborer déjà l'aldéhyde hydraacrylique ou une combinaison de cet aldéhyde, molécule intérimaire qu'il reprend ensuite afin de la déshydrater à son tour pour donner l'acroléine, ou qu'il abandonne dans le liquide, suivant la mesure de ses ressources vitales. En un mot, dans l'étude de cette fermentation, notre réactif sert non seulement à déceler l'acroléine, mais il nous permet encore de reconnaître l'aldéhyde hydraacrylique comme un produit

(1) E. VOISENET. — Sur une réaction colorée des albuminoïdes. — *Bulletin de la Société chimique*, t. 33, p. 1200, 1905.

d'acheminement de la glycérine vers son produit ultime de déshydratation. A ce sujet, nous devons ajouter qu'à l'aide de notre réaction nous avons essayé, mais en vain, de caractériser ce même corps transitoire dans la déshydratation de la glycérine par les agents chimiques. Même en employant les moyens les plus doux, il se produit dès le début de l'expérience, de l'acroléine dont la réaction masque celle de l'autre aldéhyde : remarquons d'ailleurs que ce propanolal 1,3,  $\overset{\beta}{\text{CH}_2\text{OH}} - \overset{\alpha}{\text{CH}^2} - \overset{1}{\text{CHO}}$ , présente un oxhydrile en position 3 ou  $\beta$ , condition favorable à l'élimination d'une molécule d'eau.

Si les moyens physiques ou chimiques dont nous avons utilisé l'action sur la glycérine ne nous ont pas permis à l'aide de notre réactif de caractériser sûrement l'aldéhyde hydraerylique, il convient cependant de faire remarquer que certains auteurs, en particulier Nef (1), font mention dans leurs travaux de l'existence de cet aldéhyde parmi les produits de la décomposition de la glycérine sous l'action de la chaleur, de même que sur un chemin tout différent, par la voie biologique, les résultats de nos recherches nous conduisent à pareille conclusion.

Même indépendamment de l'aveu précédent du réactif *protéique acide*, si le propanolal libre ou combiné est bien le produit aldéhydique primordial de cette fermentation déshydratante de la glycérine, il serait contraire au mécanisme normal habituel des réactions chimiques ou biochimiques, de concevoir pour l'acroléine une genèse indépendante de celle de ce corps et rattachée directement à la glycérine. Comme son nom le rappelle, l'aldéhyde hydraerylique s'obtient en effet, et c'est son mode de préparation usuel, par fixation d'eau sur l'acroléine, qu'il régénère en outre par réaction inverse de déshydratation sous la seule action de la chaleur, ou avec l'aide d'un corps avide d'eau.

Est-ce à dire que ce propanolal doit figurer en nature à l'état de liberté, dans le liquide de fermentation, et que de sa molécule, elle-même, préformée, doit dériver l'acroléine ? Le simple schéma :



(1) J.-U. NEF. — Dissociationsvorgänge in der Glycol-Glycerinreihe. — *Annalen der Chemie und Pharmacie*, t. 335, p. 200, 209 ; 1904.

que nous venons de commenter plus haut, doit être plus compliqué en réalité.

Déjà dans la déshydratation de la glycérine par les agents physiques ou chimiques, nous savons qu'il se produit des corps complexes : éthers de la glycérine, tels que diglycérine ou polyglycérides plus condensés et d'autres composés mal connus. Si l'opération de la transformation biologique d'une molécule peut dans certains cas être plus simple que celle de sa modification chimique équivalente, en raison de la modération même des moyens dont elle dispose, mais surtout grâce à une fonction physiologique spéciale par laquelle les ferments se comportent comme de véritables et puissants réactifs, capables de scinder régulièrement les molécules des corps organiques ou d'opérer des synthèses, il est à présumer cependant que celle dont nous nous occupons actuellement doit sortir du cadre étroit que nous venons de lui tracer, et qui nous est commode pour l'explication en gros du phénomène.

Nous n'avons pas isolé en nature l'aldéhyde hydracrylique ; quand même existerait-il à cet état dans le liquide, son extraction serait impossible, vu la trop faible quantité de cette substance contenue dans ce liquide, même au moment où sa proportion atteint son maximum : ajoutons que cette transformation de la glycérine ne permet pas davantage l'obtention de l'acroléine à l'état de pureté. Deux raisons fondamentales s'opposent à la préparation par voie fermentaire de ces deux aldéhydes à l'état défini, sans mélange : leur mutation continuelle et leur propriété antiseptique ; ce dernier caractère plaçant en situation d'infériorité la méthode *vitale*, vis-à-vis de celle qui utilise des moyens purement physiques ou chimiques. En ce qui concerne le premier de ces composés, nous avons simplement reconnu la formation d'un corps transitoire à fonction aldéhydique révélée à la fois par le réactif de Schiff au bisulfite de rosaniline et notre réactif *protéique acide*. Si ce dernier, par la coloration spéciale qu'il fournit peut nous faire soupçonner la présence de l'aldéhyde hydracrylique, il est impuissant à nous en dévoiler la forme chimique : aldéhyde libre, acétalisé, aldolisé, ou polymérisé, toutes formes qui donnent la même réaction colorée, en vertu de leur faculté de régénération facile de l'aldéhyde constituant.

Évidemment, il plairait à l'esprit de voir dans une expé-



rience directe reproduite avec le ferment que nous étudions, l'aldéhyde hydracrylique libre donner lui-même naissance à l'aldéhyde acrylique. Cette épreuve, si elle était positive, contribuerait plutôt à accroître notre assurance sur la formation du propanolal dans nos cultures, qu'à accentuer le caractère déshydratant de la fermentation actuelle suffisamment établi, et à son plus haut degré, par l'obtention de l'acroléine aux dépens de la glycérine.

En vérité, au cours de divers essais de culture du ferment en milieu additionné d'aldéhyde hydracrylique et sur lesquels nous aurons à revenir, nous n'avons pu reconnaître la formation d'acroléine. Cet insuccès n'infirme pas la possibilité de cette déshydratation biologique, réaction relativement facile à effectuer par voie physique ou chimique : il peut tenir au mode opératoire, à l'action paralysante exercée sur le ferment par l'aldéhyde se comportant comme un antiseptique, en l'empêchant alors de manifester cette activité maxima dont il a besoin pour aboutir à la création de l'acroléine ; mais il peut aussi dépendre de ce fait que dans la transformation à partir de la glycérine, le ferment se trouverait en présence d'aldéhyde hydracrylique à l'état naissant, par conséquent à aptitude réactionnelle beaucoup plus grande. Enfin, qu'il s'agisse d'état naissant ou de préformation, le résultat continuera à demeurer négatif, si l'aldéhyde doit se présenter au ferment sous forme de combinaison dont il resterait à déterminer la nature.

En résumé, dans ce procès fermentatif de la glycérine conduisant à la déshydratation d'au moins une partie de cette substance, *la production primitive d'un corps à fonction aldéhydrique donnant la réaction colorée de l'aldéhyde hydracrylique ; la formation secondaire de l'acroléine ; la dépendance étroite de la présence de chacun de ces deux aldéhydes avec la variabilité de l'énergie fonctionnelle du ferment ; le mécanisme progressif habituel des réactions de déshydratation comme d'hydratation ; l'analogie des transformations chimiques et biochimiques*, constituent un faisceau de faits qui autorisent à identifier ce dérivé immédiat de la glycérine avec l'aldéhyde hydracrylique lui-même ou l'une de ses combinaisons.

En rectifiant les liquides de culture qui donnent avec le réactif *protéique acide* la coloration verte, signe de la



richesse maxima en acroléine, nous avons pu isoler une quantité suffisante de cet aldéhyde pour le caractériser par sa transformation en acide acrylique sous forme de son sel d'argent.

Chaque culture du volume de cinq litres, est soumise à la distillation et le premier fractionnement est rectifié une seconde fois sur de l'oxyde de plomb, pour fixer les traces d'acides volatils : ce dernier distillatum, du volume de 1000<sup>cc</sup> environ, est aussitôt mis en rapport avec de l'oxyde d'argent récemment précipité et bien lavé; on abandonne pendant deux jours à la température ordinaire et dans l'obscurité en agitant fréquemment : au bout de ce temps, l'odeur acrylique a disparu; on porte à l'ébullition et on filtre.

L'ensemble des liqueurs ainsi obtenues, du volume de un litre environ, et provenant de cinquante litres de culture, est additionné de carbonate de soude jusqu'à réaction faiblement alcaline : on filtre à nouveau, et la liqueur est soumise à la distillation. Le distillatum saturé à chaud par de l'oxyde d'argent, filtré, laisse déposer par refroidissement dans l'obscurité, des cristaux prismatiques à éclat velouté, brunissant lentement à la lumière. Ce fractionnement cristallin, recueilli et complètement séché à 95° dans une étuve à air, pèse 18<sup>r</sup>. 28. Soumis à l'analyse, 08<sup>r</sup>.5778 ont donné : 08<sup>r</sup>.4204 CO<sup>2</sup>; 08<sup>r</sup>.0904 H<sup>2</sup>O; 08<sup>r</sup>.3498 Ag; nombres qui permettent d'établir les compositions centésimales suivantes :

|    | Trouvé | Calculé pour C <sup>3</sup> H <sup>3</sup> O <sup>2</sup> . Ag |
|----|--------|----------------------------------------------------------------|
| C  | 19.85  | 20.11                                                          |
| H  | 1 74   | 1.68                                                           |
| O  | »      | 17.88                                                          |
| Ag | 60.54  | 60.33                                                          |

résultats qui concordent avec la composition de l'acrylate d'argent.

Il est à remarquer que dans cette opération la présence d'aldéhyde hydracrylique ne nuit pas à l'exactitude de l'analyse : l'acide résultant de son oxydation étant décomposé par l'acide sulfurique en eau et acide acrylique.

#### Caractères généraux du ferment.

En déposant sur une lame une goutte de culture et la colorant légèrement avec du bleu de méthylène boracique ou même sans coloration, l'examen microscopique révèle la présence de nombreux bacilles en forme de bâtonnets.

*Obtention d'une culture pure.* — Le ferment a été purifié par ensemencements successifs dans le même milieu; de préférence purement minéral, puis isolé par des cultures

sur plaques de gélatine. Les colonies sont tardives, minuscules, arrondies, blanchâtres, non liquéfiantes. Une trace d'une colonie ensemencée dans ce milieu de Laurent peptoné, de composition précédemment donnée, maintenu à la température de 30°, nous a procuré une culture d'un bacille présentant les caractères suivants que nous résumons simplement ici, leur exposition en détail se trouvant mieux à sa place dans la troisième partie de ce travail.

**MORPHOLOGIE ET BIOLOGIE GÉNÉRALE.** — Petits bâtonnets, mesurant en moyenne 0.8 $\mu$  de largeur sur 2 $\mu$  à 4 $\mu$  de longueur, généralement séparés, quelquefois soudés bout à bout, en ligne droite, courbe ou sinueuse, formant dans les cultures anciennes des filaments plus ou moins longs : bacille ordinairement très mobile, ne prenant pas le Gram, anaérobie facultatif, sporifère lorsqu'il se trouve dans des conditions de vie défectueuse, spores résistant à la dessiccation et à une chaleur sèche de 100° : ne donnant pas d'indol dans les milieux peptonés, mais un peu d'ammoniaque ; transformant en nitrite le nitrate de potasse, coagulant le lait ; très facile à cultiver, avec température optima de développement comprise entre 30° et 35°, s'accommodant de liquides nutritifs minéraux dans lesquels on dissout la matière fermentescible : il végète dans le bouillon peptoné et phéniqué à 1 pour 1000, à la température de 42°, et réduit le *rouge neutre* en faisant virer la coloration rouge rubis des milieux qui en renferment en donnant très lentement une coloration orangée avec fluorescence très faible.

**CARACTÈRES BIOCHIMIQUES.** — Il fait fermenter les sucres : en particulier, le glucose, le lévulose, le galactose, le sucre interverti ; le saccharose, le lactose, le maltose ; et divers alcools polyatomiques, notamment la glycérine et la mannite qu'il transforme activement ; la dulcite et l'érythrite subissent lentement un commencement de fermentation. Il n'agit que modérément sur la dextrine et reste inactif vis-à-vis de l'amidon.

A part l'aldéhyde hydracrylique et l'acroléine, ainsi que leurs dérivés, par polymérisation, acétalisation, résinification ; par hydrogénation, comme le glycol triméthylénique, ou décomposition par l'eau, comme l'acide acrylique, qu'il fournit avec la glycérine, les produits de ces fermentations sont les suivants : mélange gazeux constitué par

de l'hydrogène en proportion dominante et de l'anhydride carbonique; alcool éthylique; acides formique, acétique, une petite quantité d'acide volatil insoluble, présentant les caractères de l'acide caprylique, et les acides lactique et succinique.

*Remarque.* — Tous les faits précédents relatifs à la transformation de la glycérine ont été reproduits et contrôlés avec l'espèce pure, cultivée en milieu glycérimé peptoné ou purement minéral.

### Production de Glycol triméthylénique

Il est à remarquer que cette fermentation de la glycérine donne lieu à la formation d'une quantité appréciable de *glycol propylénique normal*, *propane-diol 1.3* ou *glycol triméthylénique*.

Nous avons reconnu cette production en étudiant l'action en milieu minéral additionné de carbonate de chaux et en recherchant si la transformation de la matière fermentescible était complète. En utilisant les méthodes d'extraction usitées en pareil cas, nous avons obtenu invariablement un résidu sirupeux à saveur chaude et légèrement sucrée que nous avons pris tout d'abord pour de la glycérine, mais qui n'en contient pas trace si la fermentation a été suffisamment prolongée et en prenant soin de protéger le bacille contre l'acidité du milieu par l'agitation journalière du liquide destinée à remettre en suspension le carbonate de chaux : ce résidu chauffé avec du bisulfate de potasse ne donne en effet aucun dégagement d'acroléine.

Pour l'étudier, nous l'avons produit en plus grande quantité en soumettant à la fermentation 300 gr. de glycérine en milieu purement minéral afin de ne pas être gêné par la peptone ou ses dérivés et d'obtenir plus facilement un produit pur.

Le liquide minéral de Laurent additionné de 30 gr. de glycérine par litre est réparti dans des flacons à l'émeri de un litre, dans chacun desquels on a introduit 20 gr. de carbonate de chaux; après stérilisation et refroidissement, on ensemence avec l'espèce pure et les flacons pleins et munis de leurs bouchons sont placés à l'étuve à 30°; on agite matin et soir; au bout de trois semaines, la fermentation est terminée et complète.

Le liquide séparé du carbonate de chaux résiduel est soumis à la

distillation jusqu'à réduction au cinquième ; on précipite exactement la chaux par l'acide oxalique que l'on ajoute ensuite en très léger excès pour libérer les acides de leurs combinaisons alcalines : on filtre et le liquide est évaporé au bain-marie jusqu'à réduction au dixième, puis finalement dans le vide : il se forme un abondant dépôt de sulfate d'ammoniaque ; on reprend par l'alcool absolu qui insolubilise complètement ce sel, on filtre, et on évapore à nouveau au bain-marie d'abord, puis dans le vide pour achever de séparer l'alcool. On obtient ainsi un liquide sirupeux que l'on triture avec du sable et que l'on épuise par l'éther concentré pour enlever les acides fixes : le résidu incorporé au sable est ensuite dissous par l'alcool, et la solution évaporée comme précédemment abandonne un produit sirupeux très épais, légèrement coloré en brun qui est constitué presque uniquement par du *glycol triméthylénique* mélangé à une petite quantité d'une matière azotée d'excrétion du bacille.

En soumettant ce produit à la distillation fractionnée, il se dégage d'abord à  $78^{\circ}$ , des traces d'alcool, ensuite et jusque vers la température de  $150^{\circ}$ , une notable quantité de vapeurs à odeur et à réaction ammoniacale ; puis le thermomètre monte rapidement et se fixe à  $214^{\circ}$ , température à laquelle il distille un produit incolore, sirupeux, très épais, à odeur faiblement empyreumatique, à saveur chaude et légèrement sucrée.

Ce liquide ne renferme pas trace de glycérine et présente les caractères d'un alcool : exposé longuement à l'air, il s'oxyde lentement en donnant un aldéhyde reconnaissable par le réactif de Schiff ; l'oxydation par l'eau oxygénée en liqueur très diluée et en présence de sulfate ferreux, suivie de l'élimination du fer et de l'acide sulfurique par l'eau de baryte donne immédiatement et avec plus d'intensité le même résultat ; de plus, l'aldéhyde ainsi engendré fournit avec le réactif *protéique acide* les caractères de coloration de l'aldéhyde hydracrylique : tous résultats qui, à eux seuls, suffiraient presque à caractériser le propylglycol normal.

Soumis à une deuxième rectification, puis à l'analyse élémentaire, 0 gr. 3520 de ce produit ont donné : 0 gr. 6115  $\text{CO}_2$  ; 0 gr. 3396  $\text{H}_2\text{O}$  ; nombres qui permettent d'établir les compositions centésimales suivantes :

|   | Trouvé | Calculé pour $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$ |
|---|--------|-----------------------------------------------|
| C | 47.40  | 47.37                                         |
| H | 10.71  | 10.52                                         |
| O | »      | 42.11                                         |

résultats qui concordent avec la composition d'un propylglycol.



### Conséquences de la formation de Glycol triméthylénique

La production du propylglycol normal que nous avons aussi observée dans l'étude du *Bacillus amaracrylus* est intéressante, car elle peut servir d'appui à l'existence de l'aldéhyde hydracrylique jusqu'ici simplement mais déjà amplement révélé par une réaction colorée, par sa qualité de corps aldéhydique dérivé de la glycérine et transformable en acroléine, ainsi que par des considérations chimiques et biochimiques d'ordre général.

Ce propanolal, corps de transition entre la glycérine et l'acroléine, autre dérivé dont la présence a été dûment constatée, ne jouerait-il pas le même rôle entre la glycérine et le propylglycol dont il est précisément l'aldéhyde et dont l'analyse du liquide révèle également l'existence ?

Sachant que cette fermentation de la glycérine est accompagnée d'une production abondante d'hydrogène, résultant de sa transformation analytique, en alcool, en acides formique, acétique, lactique, ou peut-être, même de sa transformation synthétique sous forme d'acide succinique, cette hypothèse fondée sur la génération classique d'un alcool par hydrogénation de son aldéhyde prend l'apparence d'une très grande vraisemblance.

En résumé, cette idée étant admise, deux actions principales traduiraient cette fermentation *acrylique* et *glycolique* de la glycérine.

1° Une *déshydratation* avec production d'aldéhyde hydracrylique ; déshydratation complétée par une transformation partielle de ce corps en acroléine : cette action primordiale étant subordonnée à la présence d'un être vivant.

2° Une *hydrogénation*, transformant une autre partie de l'aldéhyde hydracrylique en son alcool, le glycol triméthylénique : cette action secondaire pouvant être purement chimique ou dépendante de l'activité protoplasmique.

L'aldéhyde hydracrylique deviendrait alors en quelque sorte le pivot de cette transformation et figurerait, même en priorité sur l'acroléine, dans la catégorie de ces corps transitoires dont la présence momentanée dans le vase à fermentation est beaucoup plus utile à reconnaître que celle des termes ultimes et définitifs, parce qu'ils traduisent le mode de fonctionnement de la cellule ferment.



Tous ces faits de l'expérience et de déduction nous ont conduit à cultiver le ferment en milieu nutritif simple ou renfermant l'une des substances sur lesquelles il agit, mannite, sucres, chacun de ces milieux étant additionné d'aldéhyde hydracrylique par petites doses et graduellement espacées, soit un gramme par litre de culture et par semaine.

La quantité maxima de cet aldéhyde tolérée par le ferment est relativement beaucoup plus grande que pour l'acroléine ; c'est ainsi que dans le milieu de Laurent peptoné, la multiplication cellulaire et la fermentation des substances précédentes se manifestent encore avec une dose de 3 grammes d'aldéhyde hydracrylique par litre.

En suivant l'évolution du propanolal dans la culture en milieu peptoné, à la température de 25° à 30°, soit avec le bisulfite de rosaniline, soit avec le réactif *protéique acide*, on constate qu'il se transforme moins lentement que dans le même milieu stérile, toutes les autres conditions étant identiques : ainsi, au début de l'expérience, la réaction aldéhydique ne se manifeste plus au bout d'une semaine pour une addition d'aldéhyde de un gramme par litre. C'est au cours de cette opération que l'on reconnaît particulièrement bien la succession des différentes colorations données par l'aldéhyde hydracrylique en solution à concentration progressivement décroissante, avec notre réactif, et que nous avons précédemment mentionnées. Pendant cette évolution, nos prévisions relativement à la formation d'acroléine par déshydratation de l'aldéhyde hydracrylique n'ont pas été confirmées, en ce sens que nous n'avons pu obtenir la coloration bleue propre à l'acroléine : mais ainsi que nous l'avons déjà fait remarquer, la réponse négative de cette expérience n'exclut pas la possibilité d'une telle déshydratation microbienne, pour les raisons précédemment données.

Dans cette transformation, nous n'avons pu reconnaître la production d'un dégagement gazeux, ni celle de l'un des acides qui naissent conjointement avec les produits acryliques dans la fermentation de la glycérine que nous étudions. Au bout d'un mois, le liquide a pris une coloration jaune beaucoup plus prononcée que dans le milieu stérile, vraisemblablement due à la production d'une matière résineuse soluble dans l'eau, ou résine à caractère acide, qui, en se combinant avec les traces d'ammoniaque libre existant toujours dans le milieu et provenant, comme nous l'avons

expliqué, soit de la dissociation permanente du sulfate d'ammoniaque, soit de la vie bactérienne elle-même et aux dépens de la peptone, donnerait un résinate soluble : ajoutons que l'ammoniaque doit également contribuer avec l'activité microbienne à provoquer cette résinification de l'aldéhyde hydracrylique. A ce sujet, mentionnons que l'on observe habituellement un jaunissement analogue des vins profondément altérés par la maladie de l'amertume et qui peut être attribué à une cause semblable.

En ce qui concerne la vérification de l'hypothèse que nous avons émise relativement à la formation du glycol triméthylénique par hydrogénation de son aldéhyde, nous avons effectivement reconnu cette production en ajoutant par doses fractionnées l'aldéhyde hydracrylique à des cultures en milieu minéral tenant en dissolution de la mannite ou du sucre. Pour cette recherche, afin de pouvoir isoler plus facilement le glycol, et obtenir un meilleur rendement, nous avons évité l'addition de peptone et l'opération a été effectuée en présence de carbonate de chaux pour entretenir l'activité bactérienne pendant une durée suffisante : le propylglycol ainsi produit a été isolé et reconnu d'après la méthode et les réactions précédemment indiquées.

En considérant ces transformations de l'aldéhyde hydracrylique et en les adjoignant à celles de l'acroléine, particulièrement instable, il convient encore de remarquer que s'il n'est pas possible de faire la part de la glycérine qui subit ainsi cette évolution aldéhydique, la production et la transformation incessantes de ces aldéhydes dans le vase à fermentation nous autorisent cependant à reconnaître l'importance de cette proportion.

En résumé, nous n'avons pu, à partir du propanolal, faire naître l'acroléine par action fermentaire directe : de plus, à part la production du glycol triméthylénique, cette même action ne nous a pas montré explicitement ce premier dérivé simplifié de la glycérine comme un édifice moléculaire obligatoirement nécessaire à l'acheminement de cette substance vers chacun des autres groupements plus simples ou plus complexes auxquels aboutit sa fermentation actuelle. C'est là une remarque nécessaire, mais qui n'est certainement pas suffisante, en raison de l'insuffisance même des moyens offerts à notre microbe dans une expérience *directe* se rap-

portant à un corps *préformé* et à l'état libre, comparative-ment à ceux qu'il se crée lui-même progressivement, selon ses ressources vitales, au cours des étapes successives de sa transformation de la glycérine. A ce sujet, dans l'igno-  
rance où nous sommes du détail de la vie protoplasmique et de ses exigences, n'oublions pas qu'en bactériologie les résultats négatifs ne font qu'autoriser le doute et n'ont par eux-mêmes aucune signification.

REMARQUE. — La production de glycol propylénique normal a déjà été reconnue au cours de diverses transformations de la glycérine par voie biologique.

D'après Freund (1), cet alcool se forme en proportions importantes dans certaines fermentations de la glycérine par des *Schizomycètes*, opérées en présence de carbonate de chaux. En particulier cet auteur, ainsi que Fitz (2), ont trouvé ce glycol dans les produits de fermenta-  
tion de la glycérine par le *Bacillus butylicus* : on peut même à l'aide de cette transformation réaliser la préparation de ce propylglycol (3), qui dériverait de la glycérine par action réductrice de l'hydrogène suivant l'équation :



Enfin, d'après Noyes (4), on trouve parfois ce glycol en quantité notable dans les glycérines fermentées des savonneries. Etant donnée la diffusion dans les eaux du bacille que nous étudions, il est vrai-semblable, dans ce cas particulier, d'attribuer la production du glycol triméthylénique à l'action de ce bacille.

(1) FREUND. — *Monatsh. f. Chem.*, **2**, 638 ; 18881.

(2) FITZ. — *Berichte der Deutsch. Chem. Ges.*, **9**, 1348 ; **10**, 2226, 2276 ; **11**, 1892 ; **12**, 480 ; **13**, 1311.

(3) HENNINGER. — Notice sur la préparation du Glycol triméthylénique. — *Agenda du Chimiste*, 1883.

(4) A. NOYES. — *Am. Chem. Journ.*, **19**, 766 ; 1897.



## TROISIÈME PARTIE

---

### Étude comparative du bacille isolé de l'eau avec le *Bacillus amaracrylus* retiré d'un vin amer et avec d'autres microbes contenus dans les eaux.

---

De l'ensemble des faits précédents il résulte que, par ses caractères morphologiques, par ses propriétés biochimiques, au moins qualitatives, ce ferment retiré des eaux apparaît comme identique au *Bacillus amaracrylus* isolé des vins amers. Il convient de rechercher si cette ressemblance s'affirme encore par l'analyse quantitative des produits formés et surtout si ce ferment ensemencé dans un vin de composition favorable à son développement, peut lui communiquer la maladie de l'amertume.

Pour répondre à la première question, nous avons soumis à l'action de ce ferment chacune des substances suivantes : glycérine, mannite, glucose, saccharose, et dosé les produits qui en résultent. Chacune de ces fermentations a été effectuée en milieu minéral avec addition de carbonate de chaux et en suivant en tous points la technique opératoire et la méthode analytique employées dans l'étude du ferment des vins amers.

Ajoutons dès maintenant qu'une dissemblance entre les résultats de fermentation que nous nous proposons d'obtenir avec ce nouveau ferment et ceux précédemment attribués au bacille de l'amertume des vins ne saurait, à elle seule, relâcher le lien de rapprochement que nous cherchons à reconnaître entre ces deux êtres, puisque, ainsi que nous le rappelons et que nous l'expliquons plus loin, des perturbations profondes dans la nature et le rapport des produits formés résultent de conditions différentes tenant à l'âge et à



l'éducation de la semence, à la réaction du milieu, à la durée de la fermentation ; et que, la ressemblance entre ces résultats pourrait même n'être que le fait d'une coïncidence et provenir de l'œuvre de deux microbes différents.

Aussi, les nouvelles expériences de fermentation que nous avons entreprises et dont nous reproduisons ici les résultats, ont eu dans notre pensée autant pour but de compléter l'étude de la fonction physiologique de ce nouveau ferment, que de savoir si elles peuvent contribuer au rapprochement, à l'identification de deux êtres microbiens.

### Fermentation de la Glycérine

Résultats obtenus avec dix grammes de glycérine par litre de culture.

#### ANALYSE DES GAZ

*Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures, et gaz dissous, par litre de culture :*

|                                      | Volume             | CO <sup>2</sup>   | H                 |
|--------------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| 1 <sup>er</sup> fractionnement.....  | 160 <sup>cc</sup>  | 42 <sup>cc</sup>  | 118 <sup>cc</sup> |
| 2 <sup>e</sup> — .....               | 214                | 62                | 152               |
| 3 <sup>e</sup> — .....               | 203                | 77                | 126               |
| 4 <sup>e</sup> — .....               | 192                | 77                | 115               |
| 5 <sup>e</sup> — .....               | 138                | 65                | 73                |
| 6 <sup>e</sup> — .....               | 114                | 59                | 55                |
| 7 <sup>e</sup> — .....               | 105                | 57                | 48                |
| 8 <sup>e</sup> — .....               | 74                 | 42                | 32                |
| 9 <sup>e</sup> — .....               | 30                 | 18                | 12                |
| 10 <sup>e</sup> — (durée : 10 jours) | 25                 | 17                | 8                 |
| Total des gaz dégagés.....           | 1255 <sup>cc</sup> | 516 <sup>cc</sup> | 739 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous.....                     | 471 <sup>cc</sup>  | 456 <sup>cc</sup> | 15 <sup>cc</sup>  |
| Gaz engendrés, par litre de culture  | 1726 <sup>cc</sup> | 972 <sup>cc</sup> | 754 <sup>cc</sup> |

*Acide carbonique provenant du carbonate de chaux.* — La quantité de carbonate de chaux dissous est égale à 3 gr. 02 : en retranchant de ce nombre la fraction de 0 gr. 27, représentant la proportion de cette substance décomposée par l'acidité phosphorique du milieu de culture, il en résulte une quantité de 2 gr. 75 dissoute par les acides engendrés, à laquelle correspond un volume de 612<sup>cc</sup> de gaz carbonique à déduire du volume total mesuré de ce gaz.

En définitive, le dégagement gazeux dans cette fermentation de la glycérine est constitué par :

$$\text{CO}^2 = 360^{\text{cc}}$$

$$\text{H} = 754^{\text{cc}}$$

## ANALYSE DU LIQUIDE

Comme les précédents, il présente une très légère odeur se manifestant surtout à la distillation et rappelant celle de l'acide caprylique ; il a une saveur fade dénuée d'amertume ; sa réaction est neutre à l'orangé et il colore le tournesol en rouge vineux : la réaction de l'acroléine qui était très accentuée au cours de la fermentation n'y est plus que faiblement positive ; cependant le liquide recolore assez fortement le bisulfite de rosaniline, signe de la présence d'un autre aldéhyde.

*Proportion de glycérine consommée : 65.8 pour 100.*

### Séparation des acides volatils et des acides fixes.

Le liquide de fermentation provenant de un litre de culture a été isolé par décantation et filtration du dépôt de carbonate et de phosphate de chaux, lequel a été ensuite épuisé par l'eau bouillante. Le volume total du liquide primitif et des eaux de lavage a été additionné de 3 gr. 60 d'acide oxalique cristallisé, puis on a procédé à l'extraction des acides volatils. Le distillatum résultant de cette opération est légèrement trouble par suite de la présence d'acide insoluble.

#### Acidité volatile insoluble.

Elle équivaut à 0 gr. 027 d'acide acétique par litre de culture, soit à  $0 \text{ gr. } 027 \times 2.4 = 0 \text{ gr. } 065$  d'acide caprylique.

#### Acidité volatile soluble.

Elle est représentée par les acides *formique*, *acétique*, *acrylique* et une trace d'acide très peu soluble dans l'eau.

ACIDITÉ TOTALE. — Elle équivaut à 1 gr. 25 d'acide acétique par litre de culture.

ACIDE FORMIQUE : 0 gr. 29 par litre de culture.

ACIDE ACÉTIQUE. — Cet acide a été évalué par deux méthodes différentes et après élimination des acides formique et acrylique.

a) *Dosage par acidimétrie* : 0 gr. 770 par litre de culture.

b) Dosage par la méthode de Duclaux :

| Fractionnements<br>successifs de 10 <sup>cc</sup> | Eau de chaux       | Fractionnements<br>totalisés | Eau de chaux       |
|---------------------------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|
| 1 <sup>er</sup>                                   | 17 <sup>cc</sup> 4 | 10 premiers cmc              | 17 <sup>cc</sup> 4 |
| 2 <sup>e</sup>                                    | 18 3               | 20 —                         | 35 7               |
| 3 <sup>e</sup>                                    | 18 6               | 30 —                         | 54 3               |
| 4 <sup>e</sup>                                    | 19                 | 40 —                         | 73 3               |
| 5 <sup>e</sup>                                    | 19 8               | 50 —                         | 93 1               |
| 6 <sup>e</sup>                                    | 20 8               | 60 —                         | 113 9              |
| 7 <sup>e</sup>                                    | 21 9               | 70 —                         | 135 8              |
| 8 <sup>e</sup>                                    | 23 5               | 80 —                         | 159 3              |
| 9 <sup>e</sup>                                    | 25 6               | 90 —                         | 184 9              |
| 10 <sup>e</sup>                                   | 29 5               | 100 —                        | 214 4              |

Dans le tableau de ces nombres, on reconnaît encore l'irrégularité de l'accroissement des quantités d'eau de chaux saturantes, et due à la présence de traces d'un acide supérieur. Nous la retrouverons également dans l'analyse des résultats des fermentations suivantes.

L'eau de chaux employée étant telle que un centimètre cube neutralise 0 gr. 0028 d'acide acétique, il en résulte que la quantité de cet acide contenue dans les cent premiers centimètres cubes est égale à :

$$214.4 \times 0^{\text{gr}}.0028 = 0^{\text{gr}}.605$$

soit pour la totalité de l'acide acétique du liquide soumis à la distillation et provenant de un litre de culture :

$$\frac{0^{\text{gr}}.605 \times 100}{80} = 0^{\text{gr}}.755$$

Moyenne des deux résultats : 0 gr. 762 d'acide acétique, par litre du liquide de fermentation.

*Estimation de l'acide acrylique* par différence entre l'acidité volatile soluble totale et l'acidité due à l'ensemble des acides acétique et formique.

|                                                      |                                       |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Acidité volatile soluble totale, en acide acétique : | 1 <sup>gr</sup> . 25                  |
| — formique                                           | — 0 <sup>gr</sup> .29 × 1 304 = 0.378 |
| — acétique                                           | — 0.762                               |

Total des acidités formique et acétique..... 1.14

|                                                 |                                                  |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Acidité <i>acrylique</i> , en acide acétique... | 1 <sup>gr</sup> .25 — 1 <sup>gr</sup> .14 = 0.11 |
| — acrylique..                                   | 0 <sup>gr</sup> .11 × 1.2 = 0.132                |

soit 0 gr. 132 d'acide acrylique par litre de culture.

Acidité *volatile* totale (soluble et insoluble), en acide acétique, par litre du liquide de fermentation :

$$18^r.25 + 08^r.027 = 18^r.277$$

#### ACIDITÉ FIXE

Elle est représentée par les acides *lactique* et *succinique* ; la liqueur renferme en outre une trace d'acide oxalique ajouté en excès : l'évaluation des acides fixes a été effectuée avec le dixième de son volume.

#### Dosage de l'acide succinique.

Poids du succinate et de l'oxalate de baryte :  $08^r.1329$

*Évaluation de l'oxalate de baryte.* — Il faut employer  $1^{ce}7$  de solution de permanganate de potasse à 2 pour 1000,

soit  $1.7 \times 08^r.002 = 08^r.0034$  de permanganate

ce qui correspond à  $2 \times 08^r.0034 = 08^r.0068$  d'acide oxalique cristallisé

ou à  $\frac{234}{126} \times 08^r.0068 = 08^r.0125$  d'oxalate de baryte  
( $C^2O^1Ba, 1/2 H^1O$ ).

Calcul de l'acide succinique :

Succinate de baryte :  $08^r.1329 - 08^r.0125 = 08^r.1204$

Acide succinique :  $08^r.1204 \times 0.4664 = 08^r.0561$

soit 0 gr. 561 d'acide succinique par litre de culture.

Acidité *acétique* équivalente :  $08^r.561 \times 1.016 = 08^r.570$

#### Dosage de l'acide lactique.

Poids du lactate de baryte anhydre :  $08^r.2520$

*Transformation du lactate de baryte en sulfate de baryte :*

|                              |             |             |
|------------------------------|-------------|-------------|
|                              | Trouvé      | Calculé     |
| Poids du sulfate de baryte : | $08^r.1914$ | $08^r.1863$ |

Calcul de l'acide lactique :

Au moyen du lactate de baryte :  $08^r.252 \times 0.5714 = 08^r.1440$

Au moyen du sulfate de baryte :  $08^r.1914 \times 0.7725 = 08^r.1478$

soit, en moyenne, une quantité de 1 gr. 459 d'acide lactique, par litre du liquide de fermentation.

Acidité *acétique* équivalente :  $18^r.459 \times 0.644 = 08^r.939$

Acidité *fixe*, en acide acétique :  $0^{\text{gr}}.570 + 0^{\text{gr}}.939 = 1^{\text{gr}}.509$

ACIDITÉ TOTALE (volatile et fixe), en acide acétique, par litre du liquide de fermentation :

$$1 \text{ gr. } 277 + 1 \text{ gr. } 509 = 2 \text{ gr. } 786$$

D'après la quantité de carbonate de chaux dissoute par les acides engendrés et égale à 2 gr. 75, l'acidité totale serait équivalente à 3 gr. 30 d'acide acétique : la différence entre ces deux nombres représente la part qui doit revenir à l'acide carbonique comme dissolvant du carbonate de chaux.

#### Recherche et dosage des alcools.

A part le *glycol triméthylénique* qui constitue le principal représentant de la fonction alcool, nous avons reconnu dans cette fermentation de la glycérine, comme dans les précédentes, la production d'alcool *éthylrique* dans la proportion de 0 gr. 90 par litre de culture.

#### Dosage du glycol triméthylénique

Dans la fermentation de la glycérine effectuée par le *Bacillus amaracrylus* et opérée en milieu minéral maintenu constamment neutre par le carbonate de chaux, nous avons pu évaluer assez commodément la quantité de propylglycol formé, précisément en utilisant les méthodes classiques de dosage de la glycérine elle-même.

Dans ce cas, en effet, la transformation de cette substance était complète : d'autre part, cet alcool triatomique en  $C^3$  est assez voisin par certaines de ses propriétés physiques du glycol propylénique normal, alcool diatomique en  $C^3$ , au moins en ce qui concerne le point d'ébullition élevé, les caractères de solubilité dans l'eau, l'alcool, l'éther acétique, et d'insolubilité dans l'éther, le chloroforme, pour qu'on puisse appliquer à chacun de ces deux alcools existant isolément dans une liqueur, les mêmes méthodes de dosage.

Dans le cas actuel, l'opération est plus compliquée : le liquide de fermentation renferme en effet en même temps que le glycol, de la glycérine non transformée, en sorte que l'extract final obtenu après traitement à l'alcool-éther ou à l'éther acétique est constitué par un mélange de ces deux substances. Dans ce mélange, il n'est pas possible de réali-



ser la séparation exacte des deux composants : soit par distillation fractionnée, en utilisant la différence entre les points d'ébullition,  $214^{\circ}$ , pour le propylglycol, et  $290^{\circ}$  pour la glycérine, sous la pression normale, différence qui subsiste sous pression réduite ; soit au moyen d'un réactif approprié qui entraînerait en dissolution l'une des substances ou la transformerait en combinaison facilement séparable, tout en respectant l'autre.

En présence de cette difficulté, nous avons utilisé une méthode de dosage, elle aussi, classique, et fondée sur la différence des densités des deux alcools. En pratique, cette méthode ne donne le plus souvent que des résultats approximatifs, leur exactitude étant subordonnée d'une part, à la possession d'un mélange composé uniquement des deux substances à doser, et d'autre part, à l'absence de contraction, le volume total du mélange étant, ainsi que nous le supposerons ici, habituellement considéré comme la somme arithmétique des deux volumes composants. Néanmoins et faute de pouvoir obtenir mieux, nous avons adopté ce procédé.

Les densités à  $15^{\circ}$  du glycol triméthylénique et de la glycérine étant respectivement, 1.055 et 1.264, appelons  $x$  la proportion de glycol contenue dans un volume mesuré  $V$  d'un mélange des deux alcools de densité  $d$  que nous aurons déterminée : l'équation,

$$x \times 1.055 + (V - x) 1.264 = V d$$

nous fera connaître, sous les réserves d'exactitude précédemment énoncées, la quantité de glycol contenue dans le volume du mélange employé, par suite dans son poids, et de là dans le poids de l'extrait total.

L'opération a été conduite comme pour un dosage de glycérine et en suivant la technique indiquée au début de ce travail, par extraction à l'alcool-éther ou à l'éther acétique : elle a porté chaque fois sur un volume de 500<sup>cc</sup> du liquide de fermentation.

Après pesée de l'extrait final de chaque opération, nous en avons mesuré, à la température de  $15^{\circ}$ , exactement un centimètre cube dans une ampoule graduée et déterminé le poids, ce qui nous a donné immédiatement la densité  $d$  du mélange : l'application de la formule précédente nous a fait

connaître ensuite la proportion de glycol contenue dans chacun des extraits.

La moyenne de deux résultats obtenus avec la même liqueur et en utilisant chacun des procédés d'extraction, nous a donné la quantité de 0<sup>gr</sup>70 de glycol triméthylénique, par litre de culture, soit pour 6<sup>gr</sup>58 de glycérine transformée.

#### RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

|                                       |                       |                         |                                          |
|---------------------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------------------------|
| Glycérine transformée, pour cent..... |                       | 65.8                    |                                          |
|                                       |                       | Par litre<br>de culture | Pour cent<br>de glycérine<br>transformée |
| Gaz {                                 | H. ....               | 754 <sup>cc</sup>       | 11460 <sup>cc</sup>                      |
|                                       | CO <sup>2</sup> ..... | 360 <sup>cc</sup>       | 5472 <sup>cc</sup>                       |
| Acidité, en acide acétique {          | totale ...            | 28 <sup>gr</sup> 786    | 428 <sup>gr</sup> 34                     |
|                                       | volatile..            | 1 277                   | 19 41                                    |
|                                       | fixe .....            | 1 509                   | 22 93                                    |
| Acides volatils {                     | formique .....        | 0 290                   | 4 41                                     |
|                                       | acétique .....        | 0 762                   | 11 58                                    |
|                                       | acrylique .....       | 0 132                   | 2 00                                     |
|                                       | caprylique .....      | 0 065                   | 0 98                                     |
| Acides fixes {                        | lactique .....        | 1 459                   | 22 17                                    |
|                                       | succinique .....      | 0 561                   | 8 52                                     |
| Alcools {                             | éthylque .....        | 0 900                   | 13 68                                    |
|                                       | propylglycol... ..    | 0 700                   | 10 94                                    |

#### RENDEMENT

|                                   |   |                       |       |   |                           |
|-----------------------------------|---|-----------------------|-------|---|---------------------------|
| Gaz                               | { | H.....                | 1.02  | } | 11.80                     |
|                                   |   | CO <sup>2</sup> ..... | 10.78 |   |                           |
| Acides volatils                   | { | formique..            | 4.41  | } | 18.97                     |
|                                   |   | acétique ..           | 11 58 |   |                           |
|                                   |   | acrylique .           | 2.00  |   |                           |
|                                   |   | caprylique            | 0.98  |   |                           |
| Acides fixes                      | { | lactique ..           | 22 17 | } | 30.69                     |
|                                   |   | succinique            | 8.52  |   |                           |
| Alcools                           | { | éthylque .            | 13.68 | } | 24.62                     |
|                                   |   | propylglycol          | 10.94 |   |                           |
| Total des produits dosés .. . . . |   |                       |       |   | 86.08 p. 100 de glycérine |

*Eléments non dosés.* — L'écart à 100 représente les éléments non dosés pour lesquels il convient de se reporter aux explications que nous avons données à la même place

dans l'étude de la fermentation de la glycérine par le bacille retiré d'un vin amer. Rappelons simplement ici que dans cette différence, l'eau provenant de la déshydratation de cette substance doit figurer pour la majeure part.

### Fermentation de la Mannite

Résultats obtenus avec dix grammes de mannite par litre de culture.

#### ANALYSE DES GAZ

*Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures, et gaz dissous, par litre de culture :*

|                                       | Volume             | CO <sup>2</sup>    | H                  |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 <sup>er</sup> fractionnement.....   | 304 <sup>cc</sup>  | 114 <sup>cc</sup>  | 190 <sup>cc</sup>  |
| 2 <sup>e</sup> — .....                | 326                | 121                | 205                |
| 3 <sup>e</sup> — .....                | 410                | 181                | 229                |
| 4 <sup>e</sup> — .....                | 415                | 189                | 226                |
| 5 <sup>e</sup> — .....                | 396                | 194                | 202                |
| 6 <sup>e</sup> — .....                | 398                | 195                | 203                |
| 7 <sup>e</sup> — .....                | 222                | 109                | 113                |
| 8 <sup>e</sup> — .....                | 219                | 107                | 112                |
| 9 <sup>e</sup> — .....                | 86                 | 52                 | 34                 |
| 10 <sup>e</sup> — (durée : 8 jours) . | 28                 | 19                 | 9                  |
| Total des gaz dégagés .....           | 2804 <sup>cc</sup> | 1281 <sup>cc</sup> | 1523 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous. . . . .                  | 322 <sup>cc</sup>  | 308 <sup>cc</sup>  | 14 <sup>cc</sup>   |
| Gaz engendrés, par litre de culture.  | 3126 <sup>cc</sup> | 1589 <sup>cc</sup> | 1537 <sup>cc</sup> |

*Acide carbonique provenant du carbonate de chaux.* — La quantité de carbonate de chaux dissous est égale à 3<sup>gr</sup>.72 ; en retranchant de ce nombre la fraction de 0<sup>gr</sup>.27 représentant la proportion de cette substance décomposée par l'acidité phosphorique du milieu de culture, il en résulte une quantité de 3<sup>gr</sup>.45 dissoute par les acides engendrés, à laquelle correspond un volume de 769<sup>cc</sup> de gaz carbonique à déduire du volume total mesuré de ce gaz.

En définitive, le dégagement gazeux dans cette fermentation de la mannite est constitué par :

$$\text{CO}^2 = 820^{\text{cc}} \quad \text{H} = 1537^{\text{cc}}$$

#### ANALYSE DU LIQUIDE

Il présente une très légère odeur sudorale se manifestant surtout à la distillation et une saveur fade de liquide fermenté ; sa réaction est neutre à l'orangé et il colore le tournesol en rouge vineux.

*Proportion de mannite consommée : 72 pour 100.*

### Séparation des acides volatils et des acides fixes.

Au volume total du liquide et des eaux de lavage du dépôt de carbonate et de phosphate de chaux, provenant de un litre de culture, on ajoute 4 gr. 5 d'acide oxalique cristallisé, puis on procède à l'extraction des acides volatils : on obtient ainsi un liquide offrant comme les précédents un aspect laiteux dû à la présence d'acide insoluble.

#### Acidité volatile insoluble.

Elle équivaut à 0<sup>gr</sup>.030 d'acide acétique, par litre de culture :  
soit à 0<sup>gr</sup>.030 × 2.4 = 0<sup>gr</sup>.072 d'acide caprylique.

#### Acidité volatile soluble.

Représentée par les acides *formique*, *acétique*, et par une trace d'acide supérieur très peu soluble dans l'eau.

*Acidité totale*. — Elle équivaut à 0 gr. 88 d'acide acétique par litre de culture.

ACIDE FORMIQUE. — 0 gr. 31, par litre de culture.

ACIDE ACÉTIQUE. — Nous avons dosé cet acide après élimination de l'acide formique, et par deux méthodes.

a) *Dosage par acidimétrie*. — 0 gr. 445 par litre de culture.

b) *Dosage par la méthode de Duclaux*.

| Fractionnements<br>successifs de 10cc. | Eau de chaux      | Fractionnements<br>totalisés | Eau de chaux      |
|----------------------------------------|-------------------|------------------------------|-------------------|
| 1 <sup>er</sup>                        | 9 <sup>cc</sup> 4 | 10 premiers cmc.             | 9 <sup>cc</sup> 4 |
| 2 <sup>e</sup>                         | 10. 4             | 20 —                         | 19. 8             |
| 3 <sup>e</sup>                         | 10. 9             | 30 —                         | 30. 7             |
| 4 <sup>e</sup>                         | 11. 1             | 40 —                         | 41. 8             |
| 5 <sup>e</sup>                         | 11. 8             | 50 —                         | 53. 6             |
| 6 <sup>e</sup>                         | 12. 9             | 60 —                         | 66. 5             |
| 7 <sup>e</sup>                         | 13. 9             | 70 —                         | 80. 4             |
| 8 <sup>e</sup>                         | 15. 4             | 80 —                         | 95. 8             |
| 9 <sup>e</sup>                         | 17. 5             | 90 —                         | 113. 3            |
| 10 <sup>e</sup>                        | 21. 2             | 100 —                        | 134. 5            |

L'eau de chaux employée étant telle que un centimètre cube sature 0<sup>gr</sup>.0028 d'acide acétique, il en résulte que la quantité de cet acide contenue dans les cent premiers centimètres cubes est égale à :

$$134.5 \times 0^{\text{gr}}.0028 = 0^{\text{gr}}.376$$

soit pour la totalité de l'acide acétique du liquide soumis à la distillation et provenant de un litre de culture :

$$\frac{0 \text{ gr. } 376 \times 100}{80} = 0 \text{ gr. } 470$$

Moyenne des deux résultats : 0<sup>gr.</sup>457 d'acide acétique, par litre du liquide de fermentation.

Acidité *volatile soluble*, en acide acétique :

$$\begin{array}{rcl} \text{Acidité formique, en acide acétique,} & 0^{\text{gr.}}31 \times 1.304 = & 0^{\text{gr.}}404 \\ \text{— acétique} & \text{—} & 0^{\text{gr.}}457 \end{array}$$

Trouvé : 0<sup>gr.</sup>88

Calculé : 0<sup>gr.</sup>861

Acidité *volatile* totale (soluble et insoluble), en acide acétique, par litre du liquide de fermentation :

$$0^{\text{gr.}}88 + 0^{\text{gr.}}035 = 0^{\text{gr.}}91$$

#### ACIDITÉ FIXE

Elle est représentée par les acides *lactique* et *succinique* ; la liqueur contient en outre une trace d'acide oxalique ajouté en excès : l'analyse quantitative a été effectuée avec le dixième de son volume.

#### Dosage de l'acide succinique.

Poids du succinate et de l'oxalate de baryte : 0<sup>gr.</sup>3610

*Évaluation de l'oxalate de baryte.* — Il faut employer 1<sup>cc</sup>1 de solution de permanganate de potasse à 2 pour 1000,

$$\begin{array}{l} \text{soit } 1.1 \times 0^{\text{gr.}}002 = 0^{\text{gr.}}0022 \text{ de permanganate} \\ \text{ce qui correspond à } 2 \times 0^{\text{gr.}}0022 = 0^{\text{gr.}}0044 \text{ d'acide oxalique cristallisé} \\ \text{ou à } \frac{234}{126} \times 0^{\text{gr.}}0044 = 0^{\text{gr.}}00814 \text{ d'oxalate de baryte} \\ \hspace{15em} (\text{C}^2\text{O}^4\text{Ba, } 1/2 \text{ H}^2\text{O}). \end{array}$$

Calcul de l'acide succinique :

$$\text{Succinate de baryte : } 0^{\text{gr.}}3610 - 0^{\text{gr.}}00814 = 0^{\text{gr.}}3528$$

$$\text{Acide succinique : } 0^{\text{gr.}}3528 \times 0.4664 = 0^{\text{gr.}}1645$$

soit 1 gr. 645 d'acide succinique par litre de culture.

$$\text{Acidité acétique équivalente : } 1^{\text{gr.}}645 \times 1.016 = 1^{\text{gr.}}671$$



### Dosage de l'acide lactique.

Poids du lactate de baryte anhydre : 0<sup>gr</sup>. 2781

*Transformation du lactate de baryte en sulfate de baryte :*

|                              |                        |                        |
|------------------------------|------------------------|------------------------|
|                              | Trouvé                 | Calculé.               |
| Poids du sulfate de baryte : | 0 <sup>gr</sup> . 2110 | 0 <sup>gr</sup> . 2056 |

Calcul de l'acide lactique :

Au moyen du lactate de baryte :  $0^{\text{gr}}.2781 \times 0.5714 = 0^{\text{gr}}.1584$   
 — sulfate de baryte :  $0^{\text{gr}}.2110 \times 0.7725 = 0^{\text{gr}}.1628$

soit, en moyenne, et par litre, 1 gr. 60 d'acide lactique.

Acidité *acétique* équivalente :  $1^{\text{gr}}.60 \times 0.644 = 1^{\text{gr}}.030$

Acidité *fixe*, en acide acétique :  $1^{\text{gr}}.671 + 1^{\text{gr}}.030 = 2^{\text{gr}}.701$

ACIDITÉ TOTALE (volatile et fixe), en acide acétique, par litre du liquide de fermentation :

$$0^{\text{gr}}.91 + 2^{\text{gr}}.701 = 3^{\text{gr}}.611$$

D'après la quantité de carbonate de chaux dissoute par les acides engendrés, l'acidité totale serait équivalente à 4 gr. 14 d'acide acétique : la différence entre ces deux nombres représente la part de l'acidité carbonique dans sa contribution à la dissolution du carbonate de chaux.

### Recherche et dosage des alcools.

De même que dans la fermentation de la mannite exercée par le bacille d'un vin amer, nous n'avons pu reconnaître que l'alcool *éthylque* comme représentant de la fonction alcool.

Sa proportion a été estimée à 1 gr. 20 par litre du liquide de culture.

### RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

|                                        |                       |                                  |
|----------------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| Mannite transformée, pour cent. ....   | 72.                   |                                  |
|                                        | Par litre de culture  | Pour cent de mannite transformée |
| Gaz { H .....                          | 1537 <sup>cc</sup>    | 21333 <sup>cc</sup>              |
| CO <sup>2</sup> .....                  | 820 <sup>cc</sup>     | 11381 <sup>cc</sup>              |
| Acidité, en acide acétique { totale... | 3 <sup>gr</sup> . 611 | 50 <sup>gr</sup> . 12            |
| { volatile..                           | 0 91                  | 12 63                            |
| { fixe .....                           | 2 701                 | 37 49                            |
| Acides volatils { formique.....        | 0 31                  | 4 30                             |
| { acétique.....                        | 0 457                 | 6 34                             |
| { caprylique .....                     | 0 072                 | 0 99                             |
| Acides fixes... { lactique.....        | 1 60                  | 22 21                            |
| { succinique .....                     | 1 645                 | 22 83                            |
| Alcool éthylque .....                  | 1 20                  | 16 65                            |

# RENDEMENT

|                               |   |                       |       |   |                         |
|-------------------------------|---|-----------------------|-------|---|-------------------------|
| Gaz                           | { | H.....                | 1.90  | } | 24.32                   |
|                               | { | CO <sup>2</sup> ..... | 22.42 | } |                         |
| Acides volatils               | { | formique..            | 4.30  | } | 11.63                   |
|                               | { | acétique ..           | 6.34  | } |                         |
|                               | { | caprylique            | 0.99  | } |                         |
| Acides fixes ..               | { | lactique ..           | 22.21 | } | 45.04                   |
|                               | { | succinique            | 22.83 | } |                         |
| Alcool éthylique.....         |   |                       | 16.65 |   | 16.65                   |
| Total des produits dosés..... |   |                       |       |   | 97.64 p. 100 de mannite |

## Fermentation du Glucose

Résultats obtenus avec dix grammes de glucose par litre de culture.

### ANALYSE DES GAZ

Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures, et gaz dissous, par litre de culture.

|                                     |  | Volume             | CO <sup>2</sup>    | H                 |
|-------------------------------------|--|--------------------|--------------------|-------------------|
| 1 <sup>er</sup> fractionnement..... |  | 198 <sup>cc</sup>  | 103 <sup>cc</sup>  | 95 <sup>cc</sup>  |
| 2 <sup>e</sup> — .....              |  | 250                | 138                | 112               |
| 3 <sup>e</sup> — .....              |  | 264                | 150                | 114               |
| 4 <sup>e</sup> — .....              |  | 256                | 153                | 103               |
| 5 <sup>e</sup> — .....              |  | 260                | 158                | 102               |
| 6 <sup>e</sup> — .....              |  | 237                | 148                | 89                |
| 7 <sup>e</sup> — .....              |  | 190                | 122                | 68                |
| 8 <sup>e</sup> — .....              |  | 113                | 82                 | 31                |
| 9 <sup>e</sup> — (durée: 10 jours)  |  | 32                 | 24                 | 8                 |
| Total des gaz dégagés.....          |  | 1800 <sup>cc</sup> | 1078 <sup>cc</sup> | 722 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous.....                    |  | 388 <sup>cc</sup>  | 376 <sup>cc</sup>  | 12 <sup>cc</sup>  |
| Gaz engendrés, par litre de culture |  | 2188 <sup>cc</sup> | 1454 <sup>cc</sup> | 734 <sup>cc</sup> |

*Acide carbonique provenant du carbonate de chaux.* — La quantité de carbonate de chaux dissous est égale à 4 gr. 45. En retranchant de ce nombre la fraction de 0 gr. 27 représentant la proportion de cette substance décomposée par l'acidité phosphorique du milieu de culture, il en résulte une quantité de 4 gr. 18 dissoute par les acides engendrés, à laquelle correspond un volume de 932<sup>cc</sup> de gaz carbonique à déduire du volume total mesuré de ce gaz.

En définitive, le dégagement gazeux dans cette fermentation du glucose est constitué par :

$$\text{CO}^2 = 522^{\text{cc}} \quad \text{H} = 734^{\text{cc}}$$

# ANALYSE DU LIQUIDE

Il possède encore une légère saveur sucrée et réduit la liqueur cupro-potassique; il colore la teinture de tournesol en rouge vineux et est neutre à l'orangé.

*Proportion de glucose consommé* : 76.92 pour 100.

## Séparation des acides volatils et des acides fixes.

Au volume total du liquide et des eaux de lavage du dépôt de carbonate et de phosphate de chaux, provenant de un litre de culture, on ajoute 5 gr. 5 d'acide oxalique cristallisé, puis on procède à l'extraction des acides volatils. On obtient ainsi une liqueur offrant un aspect opalescent dû à la présence d'un acide insoluble.

## Acidité volatile insoluble.

Elle équivaut à 0 gr. 028 d'acide acétique, par litre de culture; soit à  $0 \text{ gr. } 028 \times 2.4 = 0 \text{ gr. } 067$  d'acide caprylique.

## Acidité volatile soluble.

Représentée par les acides *formique*, *acétique*, et une trace d'acide supérieur très peu soluble dans l'eau.

*Acidité totale.* — Elle équivaut à 0 gr. 95 d'acide acétique par litre de culture.

ACIDE FORMIQUE. — 0 gr. 30 par litre de culture.

ACIDE ACÉTIQUE. — Il a été évalué après élimination de l'acide formique :

a) *Dosage par acidimétrie.* — 0 gr. 520 par litre de culture.

b) *Dosage par la méthode de Duclaux.*

| Fractionnements<br>successifs de 10 cc. | Eau de chaux     | Fractionnements<br>totalisés | Eau de chaux     |
|-----------------------------------------|------------------|------------------------------|------------------|
| 1 <sup>er</sup>                         | 11 <sup>cc</sup> | 10 premiers cmc.             | 11 <sup>cc</sup> |
| 2 <sup>e</sup>                          | 11. 8            | 20 —                         | 22. 8            |
| 3 <sup>e</sup>                          | 12. 1            | 30 —                         | 34. 9            |
| 4 <sup>e</sup>                          | 12. 5            | 40 —                         | 47. 4            |
| 5 <sup>e</sup>                          | 13. 3            | 50 —                         | 60. 7            |
| 6 <sup>e</sup>                          | 14. 5            | 60 —                         | 75. 2            |
| 7 <sup>e</sup>                          | 15. 5            | 70 —                         | 90. 7            |
| 8 <sup>e</sup>                          | 17. 4            | 80 —                         | 108. 1           |
| 9 <sup>e</sup>                          | 19. 6            | 90 —                         | 127. 7           |
| 10 <sup>e</sup>                         | 23. 5            | 100 —                        | 151. 2           |

L'eau de chaux employée étant telle que un centimètre cube sature 0 gr. 0028 d'acide acétique, il en résulte que la quantité de cet acide contenue dans les cent premiers centimètres cubes est égale à :

$$151.2 \times 0^{\text{gr}}.0028 = 0^{\text{gr}}.423$$

soit pour la totalité de l'acide acétique du liquide soumis à la distillation :

$$\frac{0^{\text{gr}}.423 \times 100}{80} = 0^{\text{gr}}.528$$

Moyenne des deux résultats : 0 gr. 524 d'acide acétique par litre du liquide de fermentation.

Acidité *volatile soluble*, en acide acétique :

|                                       |                    |                     |
|---------------------------------------|--------------------|---------------------|
| Acidité formique, en acide acétique : | 0 gr. 30 × 1.304 = | 0 gr. 391           |
| — acétique —                          |                    | 0 gr. 524           |
| Trouvé :                              | 0 gr. 95           | Calculé : 0 gr. 915 |

Acidité *volatile totale* (soluble et insoluble), en acide acétique, par litre du liquide de fermentation :

$$0 \text{ gr. } 95 + 0 \text{ gr. } 028 = 0 \text{ gr. } 978.$$

#### ACIDITÉ FIXE

Elle est représentée par les acides *lactique* et *succinique* ; la liqueur résiduelle de séparation des acides volatils renferme encore une trace d'acide oxalique ajouté en léger excès. L'acide lactique formé est un mélange de ses représentants inactif et droit.

L'analyse quantitative a été réalisée avec le dixième du volume de la liqueur.

#### Dosage de l'acide succinique.

Poids du succinate et de l'oxalate de baryte : 0 gr. 3080.

*Evaluation de l'oxalate de baryte.* — Il faut employer 3<sup>cc</sup> 8 de solution de permanganate de potasse à 2 p. 1000,

soit  $3.8 \times 0^{\text{gr}}.002 = 0^{\text{gr}}.0076$  de permanganate  
 ce qui correspond à  $2 \times 0^{\text{gr}}.0076 = 0^{\text{gr}}.0152$  d'acide oxalique cristallisé  
 ou à  $\frac{234}{126} \times 0^{\text{gr}}.0152 = 0^{\text{gr}}.0281$  d'oxalate de baryte  
( $\text{C}^2\text{O}^4\text{Ba}$ ,  $1/2 \text{ H}_2\text{O}$ ).

Calcul de l'acide succinique :

$$\text{Succinate de baryte. } 0 \text{ gr. } 3080 - 0 \text{ gr. } 0281 = 0 \text{ gr. } 2799$$

$$\text{Acide succinique... } 0 \text{ gr. } 2799 \times 0.4664 = 0 \text{ gr. } 1305$$

soit 1 gr. 305 d'acide succinique par litre de culture.

$$\text{Acidité acétique équivalente : } 1 \text{ gr. } 305 \times 1.016 = 1 \text{ gr. } 325.$$

### Dosage de l'acide lactique.

Poids du lactate de baryte anhydre : 0 gr. 4732.

*Transformation du lactate de baryte en sulfate de baryte :*

|                                 |            |            |
|---------------------------------|------------|------------|
|                                 | Trouvé     | Calculé    |
| Poids du sulfate de baryte..... | 0 gr. 3610 | 0 gr. 3499 |

Calcul de l'acide lactique :

|                                |            |                 |              |
|--------------------------------|------------|-----------------|--------------|
| Au moyen du lactate de baryte. | 0 gr. 4732 | $\times$ 0.5714 | = 0 gr. 2704 |
| — sulfate —                    | 0 gr. 3610 | $\times$ 0.7725 | = 0 gr. 2788 |

soit, en moyenne, et par litre, 2 gr. 746 d'acide lactique.

Acidité *acétique* équivalente : 2 gr. 746  $\times$  0.644 = 1 gr. 768.

Acidité *fixe*, en acide acétique : 1<sup>gr.</sup>325 + 1<sup>gr.</sup>768 = 3<sup>gr.</sup>093

ACIDITÉ TOTALE (volatile et fixe), en acide acétique, par litre du liquide de fermentation :

$$0 \text{ gr. } 978 + 3 \text{ gr. } 093 = 4 \text{ gr. } 071$$

D'après la quantité de carbonate de chaux dissoute par les acides engendrés et égale à 4 gr. 18, l'acidité totale serait équivalente à 5 gr. 016 d'acide acétique : la différence entre ces deux nombres représente la part qui revient à l'acide carbonique dans la dissolution du carbonate de chaux.

### Recherche et dosage des alcools.

L'alcool *éthylrique* seul est présent, et dans la proportion de 1 gr. 45 par litre de culture.

### RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

Glucose transformé, pour cent ..... 76.92

|                            |                           | Par litre<br>de culture | Pour cent<br>de glucose<br>transformé |
|----------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| Gaz                        | H. . . . .                | 734 <sup>cc</sup>       | 95.42 <sup>cc</sup>                   |
|                            | CO <sup>2</sup> . . . . . | 522 <sup>cc</sup>       | 67.86 <sup>cc</sup>                   |
| Acidité, en acide acétique |                           | totale. . . . .         | 4 <sup>gr.</sup> 071                  |
|                            |                           | volatile . . . . .      | 0 978                                 |
|                            |                           | fixe . . . . .          | 3 093                                 |
| Acides volatils            | formique. . . . .         | 0 30                    | 3 90                                  |
|                            | acétique . . . . .        | 0 524                   | 6 81                                  |
|                            | caprylique . . . . .      | 0 067                   | 0 87                                  |
| Acides fixes. . .          | lactique. . . . .         | 2 746                   | 35 70                                 |
|                            | succinique . . . . .      | 1 305                   | 16 96                                 |
| Alcool éthylique. . . . .  |                           | 1 45                    | 18 85                                 |



# RENDEMENT

|                               |   |                       |       |   |                          |
|-------------------------------|---|-----------------------|-------|---|--------------------------|
| Gaz                           | { | H.....                | 0.86  | } | 14.27                    |
|                               |   | CO <sup>2</sup> ..... | 13.41 |   |                          |
| Acides volatils               | { | formique..            | 3.90  | } | 11.58                    |
|                               |   | acétique...           | 6.81  |   |                          |
|                               |   | caprylique            | 0.87  |   |                          |
| Acides fixes...               | { | lactique...           | 35.70 | } | 52.66                    |
|                               |   | succinique            | 16.96 |   |                          |
| Alcool éthylique.....         |   |                       | 18.85 |   | 18.85                    |
| Total des produits dosés..... |   |                       |       |   | 97.36 p. 100 de glucose. |

## Fermentation du Saccharose

Résultats obtenus avec dix grammes de saccharose par litre de culture.

### ANALYSE DES GAZ

Gaz dégagés par périodes de vingt-quatre heures, et gaz dissous, par litre de culture :

|                                         | Volume             | CO <sup>2</sup>    | H                 |
|-----------------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| 1 <sup>er</sup> fractionnement. . . . . | 216 <sup>cc</sup>  | 120 <sup>cc</sup>  | 96 <sup>cc</sup>  |
| 2 <sup>e</sup> — . . . . .              | 249                | 148                | 101               |
| 3 <sup>e</sup> — . . . . .              | 254                | 150                | 104               |
| 4 <sup>e</sup> — . . . . .              | 256                | 151                | 105               |
| 5 <sup>e</sup> — . . . . .              | 250                | 149                | 101               |
| 6 <sup>e</sup> — . . . . .              | 255                | 153                | 102               |
| 7 <sup>e</sup> — . . . . .              | 243                | 146                | 97                |
| 8 <sup>e</sup> — . . . . .              | 162                | 104                | 58                |
| 9 <sup>e</sup> — (durée : 12 jours)     | 45                 | 28                 | 17                |
| Total des gaz dégagés. . . .            | 1930 <sup>cc</sup> | 1149 <sup>cc</sup> | 781 <sup>cc</sup> |
| Gaz dissous. . . . .                    | 392 <sup>cc</sup>  | 378 <sup>cc</sup>  | 14 <sup>cc</sup>  |
| Gaz engendrés, par litre de culture     | 2322 <sup>cc</sup> | 1527 <sup>cc</sup> | 795 <sup>cc</sup> |

*Acide carbonique provenant du carbonate de chaux.* — La quantité de carbonate de chaux dissous est égale à 4 gr. 52 : en retranchant de ce nombre la fraction de 0 gr. 27 représentant la proportion de cette substance décomposée par l'acidité phosphorique du milieu de culture, il en résulte une quantité de 4 gr. 25 dissoute par les acides engendrés, à laquelle correspond un volume de 948<sup>cc</sup> de gaz carbonique à déduire du volume total mesuré de ce gaz.

En définitive, le dégagement gazeux dans cette fermentation du saccharose est constitué par :

$$\text{CO}^2 = 579^{\text{cc}} \qquad \text{H} = 795^{\text{cc}}$$

# ANALYSE DU LIQUIDE

Il présente encore une saveur légèrement sucrée et réduit la liqueur cupro-potassique après inversion : sa réaction est neutre à l'orangé et il colore la teinture de tournesol en rouge vineux.

*Proportion de saccharose consommé : 79.20 pour 100.*

## Séparation des acides volatils et des acides fixes

Au volume total du liquide et des eaux de lavage du dépôt de carbonate et de phosphate de chaux, provenant de un litre de culture, on ajoute 5 gr. 5 d'acide oxalique cristallisé, puis on procède à l'extraction des acides volatils, opération au cours de laquelle on observe encore et surtout au début, un aspect trouble, opalescent, du liquide qui passe à la distillation.

### Acidité volatile insoluble.

Elle équivaut à 0<sup>gr</sup>.039 d'acide acétique par litre de culture, soit à 0<sup>gr</sup>.039  $\times$  2.4 = 0<sup>gr</sup>.094 d'acide caprylique.

### Acidité volatile soluble.

Représentée par les acides *formique*, *acétique*, et par une trace d'acide supérieur, très peu soluble dans l'eau.

ACIDITÉ TOTALE. — Elle équivaut à 0 gr. 889 d'acide acétique, par litre de culture.

ACIDE FORMIQUE : 0 gr. 33 par litre de culture.

ACIDE ACÉTIQUE. — Il a été évalué après élimination de l'acide formique.

a) *Dosage par acidimétrie.* — 0<sup>gr</sup>.422 par litre de culture.

b) *Dosage par la méthode de Duclaux :*

| Fractionnements successifs de 10 cc. | Eau de chaux       | Fractionnements totalisés | Eau de chaux      |
|--------------------------------------|--------------------|---------------------------|-------------------|
| 1 <sup>er</sup>                      | 7 <sup>cc</sup> 5. | 10 premiers cmc.          | 7 <sup>cc</sup> 5 |
| 2 <sup>e</sup>                       | 8 4                | 20 —                      | 15 9              |
| 3 <sup>e</sup>                       | 8 6                | 30 —                      | 24 5              |
| 4 <sup>e</sup>                       | 9                  | 40 —                      | 33 5              |
| 5 <sup>e</sup>                       | 9 7                | 50 —                      | 43 2              |
| 6 <sup>e</sup>                       | 10 9               | 60 —                      | 54 1              |
| 7 <sup>e</sup>                       | 11 8               | 70 —                      | 65 9              |
| 8 <sup>e</sup>                       | 13 6               | 80 —                      | 79 5              |
| 9 <sup>e</sup>                       | 15 7               | 90 —                      | 95 2              |
| 10 <sup>e</sup>                      | 19 5               | 100 —                     | 114 7             |

L'eau de chaux employée étant telle que un centimètre cube sature 0 gr. 0028 d'acide acétique, il en résulte que la quantité de cet acide contenue dans les cent premiers centimètres cubes est égale à :

$$114.7 \times 0 \text{ gr. } 0.0028 = 0 \text{ gr. } 321$$

soit pour la totalité de l'acide acétique contenu dans les 110<sup>cc</sup> du liquide soumis à la distillation et provenant de un litre de culture :

$$\frac{0 \text{ gr. } 321 \times 100}{80} = 0 \text{ gr. } 401$$

Moyenne des deux résultats : 0 gr. 411 d'acide acétique par litre du liquide de fermentation.

Acidité *volatile soluble* en acide acétique :

|                                      |          |           |             |
|--------------------------------------|----------|-----------|-------------|
| Acidité formique, en acide acétique, | 0 gr. 33 | × 1.304   | = 0 gr. 430 |
| — acétique, —                        |          |           | 0 gr. 411   |
| Trouvé : 0 gr. 889                   |          | Calculé : | 0 gr. 841   |

Acidité *volatile* totale (soluble et insoluble), en acide acétique, par litre du liquide de fermentation :

$$0 \text{ gr. } 889 + 0 \text{ gr. } 039 = 0 \text{ gr. } 928$$

#### ACIDITÉ FIXE

Elle est représentée par les acides *lactique* et *succinique* ; la liqueur résiduelle de séparation des acides volatils contient en outre une trace d'acide oxalique ajouté en excès. L'acide lactique formé est constitué par un mélange d'acide ordinaire et de traces d'acide droit.

L'analyse quantitative des acides fixes a été effectuée avec le dixième du volume de cette liqueur.

#### Dosage de l'acide succinique.

Poids du succinate et de l'oxalate de baryte : 0 gr. 3589

*Evaluation de l'oxalate de baryte.* — Il faut employer 1<sup>cc</sup> de solution de permanganate de potasse à 2 pour 1000.

soit  $1.7 \times 0 \text{ gr. } 0.002 = 0 \text{ gr. } 0034$  de permanganate  
 ce qui correspond à  $2 \times 0 \text{ gr. } 0034 = 0 \text{ gr. } 0068$  d'acide oxalique cristallisé  
 ou à  $\frac{234}{126} \times 0 \text{ gr. } 0068 = 0 \text{ gr. } 0125$  d'oxalate de baryte  
 ( $\text{C}^2\text{O}^4\text{Ba}$ ,  $1/2 \text{ H}^2\text{O}$ ).

Calcul de l'acide succinique :

|                       |            |              |              |
|-----------------------|------------|--------------|--------------|
| Succinate de baryte : | 0 gr. 3589 | − 0 gr. 0125 | = 0 gr. 3464 |
| Acide succinique :    | 0 gr. 3464 | × 0.4664     | = 0 gr. 1615 |

soit, 1 gr. 615 d'acide succinique par litre de culture.

Acidité *acétique* équivalente :  $1 \text{ gr. } 615 \times 1.016 = 1 \text{ gr. } 641$

### Dosage de l'acide lactique.

Poids du lactate de baryte anhydre : 0<sup>gr</sup>.4562

*Transformation du lactate de baryte en sulfate de baryte :*

|                              |                       |                       |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                              | Trouvé                | Calculé               |
| Poids du sulfate de baryte : | 0 <sup>gr</sup> .3425 | 0 <sup>gr</sup> .3374 |

Calcul de l'acide lactique :

Au moyen du lactate de baryte : 0<sup>gr</sup>.4562  $\times$  0.5714 = 0<sup>gr</sup>.2606

— sulfate de baryte : 0<sup>gr</sup>.3425  $\times$  0.7725 = 0<sup>gr</sup>.2645

soit, en moyenne, et par litre, 2 gr. 625 d'acide lactique.

Acidité *acétique* équivalente : 2<sup>gr</sup>.625  $\times$  0.644 = 1<sup>gr</sup>.690

Acidité *fixe*, en acide acétique : 1<sup>gr</sup>.641 + 1<sup>gr</sup>.690 = 3<sup>gr</sup>.331

ACIDITÉ TOTALE (volatile et fixe), en acide acétique, par litre du liquide de fermentation :

0<sup>gr</sup>.928 + 3<sup>gr</sup>.331 = 4<sup>gr</sup>.259

D'après la quantité de carbonate de chaux dissoute par les acides engendrés et égale à 4 gr. 25, l'acidité totale serait équivalente à 5 gr. 10 d'acide acétique : la différence entre ces deux nombres correspond à l'acidité carbonique qui contribue pour une part importante à la dissolution du carbonate de chaux.

### Recherche et dosage des alcools.

Seul, l'alcool *éthylque* est présent, et dans la proportion de 1 gr. 30 par litre de culture.

### RÉSULTATS DE LA FERMENTATION

|                                       |                       |                      |                                    |
|---------------------------------------|-----------------------|----------------------|------------------------------------|
| Saccharose transformé, pour cent..... |                       | 79.20                |                                    |
|                                       | Par litre de culture  |                      | Pour cent de saccharose transformé |
| Gaz {                                 | H.....                | 79.5 <sup>cc</sup>   | 100.33 <sup>cc</sup>               |
|                                       | CO <sup>2</sup> ..... | 57.9 <sup>cc</sup>   | 73.07 <sup>cc</sup>                |
| Acidité, en acide acétique {          | totale ..             | 4 <sup>gr</sup> .259 | 53 <sup>gr</sup> .75               |
|                                       | volatile..            | 0 928                | 11 71                              |
|                                       | fixe ...              | 3 331                | 42 04                              |
| Acides volatils {                     | formique.....         | 0 33                 | 4 16                               |
|                                       | acétique.....         | 0 411                | 5 18                               |
|                                       | caprylique.....       | 0 094                | 1 18                               |
| Acides fixes {                        | lactique.....         | 2 625                | 33 13                              |
|                                       | succinique.....       | 1 615                | 20 38                              |
| Alcool éthylque .....                 |                       | 1 30                 | 16 41                              |

RENDEMENT

|                                |   |                       |       |                      |       |
|--------------------------------|---|-----------------------|-------|----------------------|-------|
| Gaz                            | { | H.....                | 0.90  | {                    | 15.35 |
|                                |   | CO <sup>2</sup> ..... | 14.45 |                      |       |
| Acides volatils                | { | formique.             | 4.16  | {                    | 10.52 |
|                                |   | acétique .            | 5.18  |                      |       |
|                                |   | caprylique            | 1.18  |                      |       |
| Acides fixes                   | { | lactique..            | 33.13 | {                    | 53.51 |
|                                |   | succinique            | 20.38 |                      |       |
| Alcool éthylique.....          |   |                       | 16.41 |                      | 16.41 |
| Total des produits dosés ..... |   |                       | 95.79 | p. 100 de saccharose |       |

TABLEAU COMPARATIF DES RÉSULTATS DE FERMENTATION OBTENUS  
AVEC LA GLYCÉRINE, LA MANNITE, LE GLUCOSE ET LE SACCHAROSE

POUR CENT PARTIES DE SUBSTANCES

|                                  |   | Glycérine               | Mannite | Glucose | Saccharose |
|----------------------------------|---|-------------------------|---------|---------|------------|
| Gaz                              | { | hydrogène.....          | 1.02    | 1.90    | 0.86       |
|                                  |   | acide carbonique.....   | 10.78   | 22.42   | 13.41      |
| Acidité                          | { | totale.....             | 42.34   | 50.12   | 52.92      |
| acétique                         |   | volatile.....           | 19.41   | 12.63   | 12.71      |
|                                  |   | fixe.....               | 22.93   | 37.49   | 40.21      |
| Acides                           | { | formique.....           | 4.41    | 4.30    | 3.90       |
|                                  |   | acétique.....           | 11.58   | 6.34    | 6.81       |
|                                  |   | acrylique.....          | 2.00    |         |            |
|                                  |   | caprylique.....         | 0.98    | 0.99    | 0.87       |
|                                  |   | lactique.....           | 22.17   | 22.21   | 35.70      |
|                                  |   | succinique.....         | 8.52    | 22.83   | 16.96      |
| Alcools                          | { | éthylique.....          | 13.68   | 16.65   | 18.85      |
|                                  |   | triméthyléneglycol..... | 10.94   |         |            |
| Rendement en éléments dosés..... |   | 86.08                   | 97.64   | 97.36   | 95.79      |

Comparaison des résultats de fermentation obtenus avec le bacille  
de l'amertume des vins et celui retiré des eaux.

Au point de vue *qualitatif* les résultats fournis par les deux ferments sont identiques.

Avec les alcools polyatomiques, glycérine, mannite et les sucres, on observe le même dégagement gazeux d'hydrogène et d'anhydride carbonique; la même production des acides, formique, acétique, lactique, succinique, accompagnés de traces d'acide volatil insoluble; enfin, la formation constante d'alcool éthylique.

Avec la glycérine, l'action est spéciale, mais toujours iden-



tique pour les deux bacilles qui fournissent, outre les produits d'analyse et de synthèse précédents, les aldéhydes hydracrylique et acrylique dont la formation exprime le caractère *déshydratant* de la fermentation, et les multiples dérivés de ces aldéhydes, comme l'acide acrylique et le glycol triméthylénique.

Au point de vue *quantitatif*, les résultats sont sensiblement analogues : l'examen comparatif des tableaux analytiques révèle les différences principales suivantes :

La transformation de chacune des substances fermentescibles est plus lente et moins complète avec le bacille des eaux : mais, ce caractère différentiel n'est pas définitif et nous en donnerons plus loin la preuve.

La comparaison des proportions centésimales de chacun des produits formés montre que, pour la glycérine et la mannite, le dégagement d'hydrogène est moindre avec le bacille des vins amers qu'avec celui de l'eau ; l'acide carbonique variant en sens inverse : pour les hydrates de carbone, le dégagement des deux gaz est le plus élevé avec le ferment des vins amers.

L'acidité totale est toujours plus grande avec le bacille des eaux et l'accroissement porte uniquement sur l'acidité fixe ; l'acidité volatile étant constamment inférieure à celle produite par le ferment de l'amer : dans chaque cas, l'acide lactique contribue à cette augmentation de l'acidité fixe.

Parmi les substances fermentescibles soumises à l'étude, le maximum de rendement en acide acétique est obtenu avec la glycérine sous l'action du bacille des eaux.

Pour chacune d'elles, les proportions respectives d'acide formique et d'alcool éthylique sont moindres avec ce dernier ferment qu'avec celui des vins amers : le glycol triméthylénique varie dans le même sens. Cette fluctuation de l'alcool éthylique est en accord avec celle de l'acide carbonique.

Il convient d'observer que la comparaison générale que nous venons d'envisager n'offre qu'un intérêt de second ordre en raison du caractère incomplet de l'un des modes de transformation.

La concordance quantitative des résultats fournis par les deux ferments ne peut d'ailleurs être que relative, car elle ne se produirait pas d'une façon absolue et invariable,

même en opérant avec des milieux identiques ensemencés avec une même culture et soumis à des conditions extérieures apparemment semblables.

Des germes, choisis aussi identiques que possible, issus d'un même organisme ou d'un même milieu cultural, considérés si l'on veut sous forme de graines venant d'un même fruit, pourront cependant posséder des différences dans la constitution de leur protoplasma qui les obligeront à réagir différemment sous l'influence des mêmes excitations. Aussi bien dans le monde des infiniments petits que dans celui des êtres supérieurs, la communauté d'origine ne saurait impliquer l'équivalence dans le travail accompli, lequel dans une fermentation reste subordonné à des influences très-diverses, comme les suivantes : réaction primitive du milieu d'ensemencement et réactions successives de ce milieu au cours de l'opération ; âge de la semence ; nombre des travailleurs microbiens composant chacune des équipes primitivement mises en œuvre ; activité fermentaire individuelle ; éducation de la semence en rapport avec le milieu de culture dans lequel on la prend, ou adaptation plus ou moins parfaite entre le microbe et l'aliment, etc.

Toutes autres conditions étant égales, la fermentation par sa marche elle-même, amène des circonstances nouvelles qui ne sont pas nécessairement les mêmes dans tous les cas et peuvent influencer les résultats : aussi la comparaison que nous poursuivons, à l'aide d'expériences faites dans des conditions en apparence identiques peut n'être pas tout à fait valable et être même illusoire. Depuis qu'on cherche à différencier les microbes par l'étude de leurs fonctions physiologiques basée sur leurs propriétés fermentaires, on a maintes fois reconnu que deux expériences simultanées faites dans des conditions aussi comparables que possible, avec le même ferment agissant sur la même substance sucrée, ne sont jamais identiques, au moins quantitativement. A ce point de vue, le réactif *vivant* constitué par un microbe, soumis à des nécessités vitales diverses, ne peut être aussi constant dans ses effets que le réactif *inerte*, purement chimique, du laboratoire.

La très fréquente variabilité d'action à l'égard d'une même matière alimentaire, montre que chez divers microbes la fonction protoplasmique est très complexe, et à l'inverse de ce que l'on observe pour la levure de bière, si exclusive en

apparence sur le choix de ses aliments et si constante dans son action sur les sucres. Comme le dit Duclaux (1) : « dans l'étude des fermentations on trouve des propriétés dissimilaires chez le même être et des propriétés semblables chez des êtres sûrement différents : où chercher alors la caractéristique de l'espèce ? les difficultés augmentent encore quand on songe aux variations qui peuvent résulter de l'éducation de la semence et de ses antécédents plus ou moins héréditaires. »

Cette inconstance de l'action d'un même microbe sur une même substance fermentescible, soit au cours des étapes successives de la fermentation, soit dans l'examen du bilan final, étant reconnue, à plus forte raison l'irrégularité dans les résultats de l'analyse quantitative doit-elle se manifester quand ils ont été obtenus avec des ferments qui, s'ils peuvent avoir même origine, n'en ont pas moins été soumis à des conditions de vie intérieure et extérieure différentes, l'un s'étant développé dans le vin, l'autre venant directement de l'eau.

La comparaison que nous poursuivons serait certainement mieux fondée et donnerait sans doute de meilleurs résultats, au moins en ce qui concerne la quantité pour cent des substances transformées, si les fermentations précédentes avaient pu être effectuées avec le ferment isolé de l'eau et préalablement habitué à végéter dans un vin, dans lequel il aurait provoqué la maladie de l'amertume. L'éducation de l'une et de l'autre semence, toutes deux issues de vins amers, eut été alors sinon identique pour chacune d'elles, au moins très sensiblement analogue : et le ferment venu de l'eau, développé et aguerri par le passage dans ce milieu à la fois alimentaire et antiseptique constitué par le vin, aurait pu présenter une activité fermentaire supérieure à celle qu'il possède au sortir des milieux de culture précédents où nous l'avons prélevé pour reproduire nos expériences de fermentation.

Mais, ainsi que nous l'exposons dans ce qui suit, nous nous sommes heurté à une véritable difficulté dans nos essais d'acclimatation dans le vin de ce ferment retiré de l'eau : aussi avons-nous dû nous borner tout d'abord aux

(1) E. DUCLAUX. — *Traité de Microbiologie*, t. 4, p. 196.

expériences précédemment rapportées. Cependant, dans de nouveaux essais nous avons repris la question, en utilisant une semence prélevée dans un des liquides de culture les plus vineux, mentionnés dans le paragraphe suivant; nous avons ainsi obtenu une transformation plus complète de la glycérine et presque totale pour la mannite et les sucres. Nous enregistrons ci-dessous les résultats analytiques en ce qui concerne les proportions centésimales de glycérine, de mannite, de glucose et de saccharose transformés par le ferment ainsi acclimaté :

|                                   | Glycérine | Mannite | Glucose | Saccharose |
|-----------------------------------|-----------|---------|---------|------------|
| Substance transformée pour cent : | 93.35     | 97.71   | 98.80   | 99.15      |

Cette constatation vient à l'appui de nos prévisions précédentes sur la subordination de l'activité fermentaire à l'éducation de la semence et contribue avec les autres résultats de l'analyse quantitative, antérieurement établis, à resserrer le lien de parenté que nous avons cherché à mettre en évidence entre nos deux ferments par l'étude comparative de leur action sur les substances fermentescibles.

En effet, malgré l'insuffisance de ce critérium de l'analyse quantitative pour la caractérisation d'un microbe, et bien que nous puissions trouver des propriétés semblables chez des êtres différents, nous devons néanmoins considérer une telle similitude analytique résultant d'une telle dissemblance, comme exceptionnelle, et l'attribuer le plus généralement lorsque nous la rencontrons, à des êtres de même origine, surtout lorsque cette hérédité commune aura déjà été contrôlée par d'autres caractères.

En résumé, les résultats de l'analyse qualitative et quantitative dans nos essais sur la détermination de la fonction physiologique des deux bacilles à l'égard des substances fermentescibles, tendent à *l'identification* de ces deux êtres.

Le caractère le plus saillant de cette identité réside dans leur *commune faculté de déshydratation de la glycérine*.

ESSAI DE REPRODUCTION  
DE LA MALADIE DE L'AMERTUME DES VINS

*Le ferment retiré de l'eau ensemencé dans un vin, peut-il s'y développer et rendre le vin amer ?* — Dans ce but, nous avons effectué tout d'abord divers essais avec différents vins de Bourgogne, jeunes ou vieux, soit naturels, soit privés en partie de leur alcool par distillation ou de leur acidité par neutralisation préalable, mais sans aboutir à un résultat : dans aucun de ces liquides, le ferment issu d'une culture, soit en milieu peptoné et glycérimé ou sucré, n'a pu évoluer et se multiplier.

Par contre, après avoir fait choix de l'un de ces vins, le plus apte à contracter la maladie de l'amertume, par sa composition et aussi d'après les renseignements fournis par le propriétaire vigneron qui l'avait obligeamment mis à notre disposition (vin de Savigny-les-Beaune, récolte 1901, de titre alcoolique 10°4 et renfermant 7 gr. 23 de glycérine par litre) ; nous avons reconnu que ce même organisme se développait, souvent avec une activité admirable, dans six échantillons différents de liquides vineux ainsi constitués avec ce vin :

|                 |                                                                                                                         |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Eau de levure . | 300 <sup>cc</sup> .                                                                                                     |
| Moût de raisin. | 100 <sup>cc</sup> .                                                                                                     |
| Vin . . . . .   | 100 <sup>cc</sup> ; 200 <sup>cc</sup> ; 300 <sup>cc</sup> ; 400 <sup>cc</sup> ; 500 <sup>cc</sup> ; 600 <sup>cc</sup> . |

La rapidité de la multiplication cellulaire et l'activité fermentaire évaluée par rapport à la vitesse du dégagement gazeux étant, toutes choses égales d'ailleurs, en raison inverse de la grandeur du vinage du milieu.

La fermentation étant terminée, la recherche immédiate de l'acroléine à l'aide du réactif *protéique acide*, après distillation et en suivant la technique opératoire indiquée au début de ce travail pour la reconnaissance de cet aldéhyde dans les vins amers, a été positive pour chacun des quatre liquides les plus vineux soumis à l'expérience.

Avec les deux premiers échantillons, les moins vinés, cette recherche a conduit à un résultat négatif : cependant, l'analyse quantitative révèle la disparition d'une fraction de la petite quantité de glycérine apportée par le vin dans le milieu de culture : d'autre part, dans nos nombreuses expériences de fermentation en milieux faiblement glycérimés,



effectuées soit avec le ferment des vins amers, soit avec le bacille isolé de l'eau, nous avons maintes fois reconnu que, malgré la constatation de la production de l'acroléine au cours de la fermentation, il n'était plus possible de retrouver cet aldéhyde dans le liquide, une fois la fermentation terminée. L'insuccès de l'épreuve ainsi faite, tient à la facile altérabilité des aldéhydes, en particulier sous une action physiologique, altérabilité qui atteint son maximum pour l'acroléine, principalement lorsqu'elle naît et demeure à l'état libre, comme dans les milieux précédents moins vinés où sa production a lieu en présence d'une quantité insuffisante d'un alcool pour lui permettre de revêtir une forme plus stable à l'état d'acétal.

En réalité, en expérimentant non plus à la fin, mais au cours même de la fermentation, nous avons pu, grâce à la sensibilité du réactif, reconnaître la formation de quantités infinitésimales de cet aldéhyde, même dans ces deux milieux les moins vinés et par suite les moins riches en glycérine.

A ce moment de la fin de la fermentation, aucun des liquides vigneux précédents ne possède la saveur amère. Ce goût se développe cependant à la longue dans les échantillons les plus vinés, ainsi que nous avons pu le reconnaître en les dégustant à plusieurs reprises, après plusieurs mois de conservation ; en même temps cette modification de la saveur s'accompagne de celle de la matière colorante du vin qui est partiellement précipitée : enfin, l'examen microscopique révèle des formes microbiennes semblables à celles du ferment de l'amer.

Le bacille retiré de l'eau peut donc végéter en milieu nutritif préalablement additionné de vin et y reproduire les principaux caractères organoleptiques, chimiques et microscopiques de la maladie de l'amertume. Cette constatation suffit pour répondre affirmativement à la question posée au début de ce paragraphe de notre étude.

Néanmoins, dans le but d'amplifier cette démonstration et de la mettre en rapport plus absolu avec la réalité, nous avons essayé de cultiver dans différents vins ce ferment ainsi acclimaté en milieu viné ; mais chaque fois nos tentatives sont restées vaines.

Cet échec nous rappelle que dans l'étude du *Bacillus amaracrylus* nous avons antérieurement rencontré une

semblable difficulté, quoique à un degré moindre, puisque l'ensemencement du ferment issu d'un vin amer, dans divers échantillons de vins, soit naturels, soit modifiés par privation partielle de leur alcool ou de leur acidité, nous avait donné un résultat positif pour quelques échantillons, dont un de vin naturel.

La rencontre de tels obstacles montre, une fois de plus, qu'on ne peut gouverner la vie des microbes à son gré, pas plus d'ailleurs que la vie en général. En biologie comme en mécanique, le vieil axiome « la même cause produit les mêmes effets », ne reste vrai que si chacun des facteurs constituant la cause conserve une identité absolue dans chacun des phénomènes où cette cause entre en jeu.

Or, s'il est relativement facile à l'ingénieur, au chimiste ou au physicien de construire un mécanisme, de diriger une réaction ou un phénomène de façon à produire l'effet voulu, le biologiste est beaucoup moins maître de ses moyens d'action à l'égard de ce réactif vivant qu'est la cellule, précisément en raison de la multiplicité des influences auxquelles elle est soumise dans les manifestations de la vie intérieure ou extérieure à son protoplasme.

Malgré l'analogie et bien souvent l'identité, au moins en ce qui concerne le résultat final, d'une réaction accomplie par voie physique, chimique ou biologique, il existe néanmoins des différences profondes entre les conditions relativement simples des expériences du physicien ou du chimiste et celles toujours complexes, très souvent mystérieuses, des transformations élaborées dans le laboratoire de la nature. Il convient de ne pas appliquer strictement à la substance qui vit les principes ordinaires de la mécanique : on ne peut et on ne doit identifier des phénomènes qui logiquement ne sont susceptibles que de comparaison.

D'ailleurs, que savons-nous des phénomènes de la vie dans la période qui correspond à ce que nous appelons « état latent », et où elle n'est révélée ni par une évolution morphologique ni par une modification physiologique ou chimique appréciable de l'organisme ou du milieu qui lui sert d'habitat ? Cette vie mystérieuse, latente, qui doit être plutôt qualifiée de *vie ralentie*, car les phénomènes biologiques, en particulier la respiration, n'y sont pas absolument suspendus, malgré son invisibilité et son apparente inertie, ne doit-elle pas être néanmoins, en raison de l'impression-

nabilité particulière du protoplasme, le siège de transformations plus ou moins lentes, mais continues, pouvant parfois s'accomplir parallèlement à celles du milieu ou même dépendre de ces dernières, et acheminant progressivement l'être vers l'état de vie manifestée, de *vie active*, où il devient possible de le reconnaître par l'examen de ses caractères morphologiques et des modifications biologiques ou chimiques qui résultent de son développement ?

En particulier, il est hors de doute que tous les vins ferment dès leur premier âge le germe capable de déterminer ultérieurement chez certains d'entre eux la maladie de l'amertume. Dans ces liquides qui *tournent* ainsi à *l'amer*, ce germe dans sa vie simplement ralentie, pendant cette période parfois très longue qui précède l'apparition de la maladie, doit évoluer en même temps que la composition chimique du vin lui-même, tout en restant comme cette dernière soumise à l'influence des autres germes présents et des conditions extérieures. Au cours de ces transformations, le milieu devient de plus en plus favorable au développement de la semence, tandis qu'elle-ci sous l'influence des excitations extérieures qui en résultent et en vertu de l'état de mutation continue du protoplasme, subit des modifications morphologiques et physiologiques corrélatives qui augmentent sa résistance vis-à-vis des substances antiseptiques contenues dans le vin et la rendent en même temps plus apte à la consommation des matériaux alimentaires qui lui sont offerts par ce liquide. En un mot, *ce parallélisme d'évolution conduit à l'adaptation entre le microbe et son milieu nutritif, de laquelle résultera pour le premier la prospérité et pour le dernier la maladie.*

Dans les vins qui restent indéfiniment sains, la vie bactérienne persiste à l'état de vie ralentie et ce maintien est dû principalement à la composition chimique du liquide dont certains constituants à propriétés antiseptiques s'y trouvent en proportion suffisante pour lui communiquer des qualités conservatrices permanentes : cet état de santé résulte aussi de l'antagonisme microbien et de l'opportunité des conditions extérieures. Le vin ainsi demeuré sain n'en a pas moins été le siège d'une double évolution bactérienne et chimique ; mais la première, constamment paralysée par la puissance antiseptique du milieu et dans certains cas aussi par une ambiance défavorable, n'a pu aboutir à la phase de

vie active, tandis que la seconde est restée elle-même sous la simple dépendance des affinités chimiques s'exerçant entre les divers constituants du liquide et se traduisant par les phénomènes d'éthérification, d'acétalisation, etc. A aucun moment de l'existence du vin, l'adaptation entre le microbe et l'aliment, nécessaire à tout acte fermentaire, n'a pu se réaliser : dans ces circonstances, le ferment de l'amertume, comme ses congénères, est resté condamné à l'impuissance.

Ce ferment prélevé directement dans un vin amer ou indirectement, après passage dans un autre liquide de culture, apporte avec lui des qualités héréditaires dépendant du milieu dont il provient, du temps qu'il y a vécu, de son degré d'acclimatation, etc. Dans ce milieu d'origine, les cellules jeunes présentent même des habitudes et des prédispositions héréditaires différentes de celles de leurs aînées, en raison non seulement de l'âge, mais encore de la réaction sur le microbe des substances qu'il engendre au cours de la maladie ou de la fermentation. Après ensemencement dans un vin sain, chacune de ces cellules se trouve en présence de conditions différentes de celles de son milieu d'origine, lesquelles modifient ses prédispositions héréditaires en les atténuant le plus généralement, car, à moins de cas exceptionnels, le nouveau milieu est moins favorable au développement de la cellule que celui d'où elle vient et dont la composition chimique particulière assurait la multiplication.

Cette impressionnabilité spéciale du protoplasme, son état de mutation continue sous l'influence d'un ensemble d'actions physiques, chimiques et biologiques dont il est le siège, actions étroitement reliées les unes aux autres et dépendantes aussi du milieu environnant, rendent compte de l'excessive variabilité de la cause précédemment invoquée et justifient les difficultés que nous avons rencontrées dans nos essais effectués en vue de perpétuer une espèce bactérienne capable de produire la maladie de l'amertume, par ensemencement dans un vin sain préalablement stérilisé.

Mais cet insuccès vis-à-vis d'un vin naturel, ne permet pas de disqualifier ce bacille originaire de l'eau, et le pouvoir que nous lui avons reconnu d'engendrer la maladie dans un vin dilué et amendé *autorise à le considérer comme ferment de l'amer.*

---



## Comparaison entre ce bacille et d'autres microbes contenus dans les eaux

---

Par certains de ses caractères se rattachant à la morphologie, aux cultures sur les milieux habituels, aux propriétés biologiques et aux réactions chimiques, le bacille que nous étudions présente d'assez nombreuses analogies avec d'autres microbes que peuvent contenir les eaux : comme il existe aussi des dissemblances, parfois profondes, il est intéressant de faire un examen au moins succinct des uns et des autres.

Nous bornerons cette comparaison aux microbes suivants : *colibacille*, bacille *typhique* et bacilles *paratyphiques A* et *B*; en faisant encore observer que, si la présence éventuelle du bacille d'*Eberth* dans l'eau est un fait absolument acquis, on n'a pu qu'assez rarement isoler de ce liquide ce microbe sûrement caractérisé, ainsi que ses congénères, les paratyphiques.

Ce paragraphe de notre étude aura en outre l'intérêt de faire connaître par détail les caractères de ce bacille de l'eau, jusqu'ici simplement mentionnés et limités aux principaux, et de montrer leur similitude avec ceux du *Bacillus amara-crylus* précédemment décrits.

### A. — MORPHOLOGIE ET BIOLOGIE GÉNÉRALE

a) *Formes, dimensions, coloration.* — Les courts bâtonnets constituant les éléments de ce bacille présentent des dimensions voisines de celles des microbes précédents. Comme pour ces derniers, la nature du milieu et l'âge des éléments influent sur ces dimensions : les éléments très jeunes sont tout à fait courts, à peine plus longs que larges ; souvent même ils affectent une forme de coccus : les éléments âgés, surtout dans certains milieux, comme les vieilles cultures liquides glycerinées ou sur gélatine, sont plus longs, atteignant et dépassant 5 à 6  $\mu$ , parfois même ondu-



leux. Les bâtonnets sont isolés, souvent réunis par soudure bout à bout ou en petits amas.

Cette forme en bâtonnets que l'on peut considérer comme normale, n'est pas immuable ; elle subit des variations qui paraissent subordonnées à la qualité et aux conditions de milieu. Ce bacille cultivé dans les milieux additionnés d'antiseptiques, spécialement dans les milieux phéniqués n'a plus sa forme normale : comme les bacilles *coli* et *typhique*, soumis aux mêmes conditions, il a ses articles très courts, donnant même l'aspect de diplocoques.

*Coloration.* — Ce microbe de l'eau se colore facilement par les procédés ordinaires et absorbe assez rapidement les couleurs d'aniline : le bleu de méthylène boracique, le violet de gentiane, la fuchsine phéniquée de Ziehl, donnent de bons résultats.

En lui appliquant la méthode de coloration de Gram, nous avons observé les mêmes particularités qu'avec le *Bacillus amaraerylus*. En opérant suivant la méthode primitive de l'auteur, avec le violet de gentiane aniliné et la solution d'iode faible, le bacille se décolore, mais très souvent incomplètement ou seulement par une action prolongée de l'alcool : au contraire, en utilisant cette méthode modifiée par Nicolle, avec le violet de gentiane phéniqué et la solution d'iode forte, la décoloration par l'alcool-acétone est généralement facile et complète. L'ensemble des résultats nous fait ranger ce bacille dans la catégorie des microbes *ne prenant pas le Gram* ; et ce caractère le rapproche des bacilles *coli*, *typhique* et *paratyphiques*, en observant cependant que ceux-ci se décolorent constamment et facilement par application de la même méthode.

b) *Motilité.* — Comme les bacilles *coli* et *typhique*, ce microbe soumis à de bonnes conditions de culture est d'ordinaire très mobile. Sa motilité peut s'atténuer chez certains types et même disparaître dans certaines conditions, en particulier lorsque le bacille a engendré un excès d'acroline. En présence d'autres antiseptiques, spécialement dans les milieux phéniqués, et de même qu'eux, sa mobilité devient également très réduite, en même temps que se réduit la longueur de ses articles : comme eux aussi, il reprend son aspect habituel, normal, par réensemencement dans les milieux ordinaires.

Les bacilles *coli* et *typhique* doivent leur mobilité à la présence de cils vibratiles que les méthodes spéciales de coloration mettent en évidence. L'application de la méthode de Loeffler au bacille étudié nous a permis de lui reconnaître ces organes de mouvement. Comme pour le *Bacillus amaracrylus* retiré d'un vin amer, nous avons constaté la présence de cils vibratiles au nombre de 4 à 6, quelquefois moins, exceptionnellement plus. Ces cils sont répartis sur toute la périphérie des bâtonnets ou rarement en bouquet aux extrémités : souvent un très long cil se présente à l'une ou aux deux extrémités de l'élément microbien.

c) *Reproduction*. — Nous avons reconnu à ce bacille de l'eau la faculté de produire des spores ; toutefois, et de même que pour le *Bacillus amaracrylus* d'un vin amer, nous n'avons jamais observé de sporulation directe, normale, en pleine période de végétation, mais seulement dans certaines conditions d'existence difficile. Dans des cultures en milieu minéral glycérimé anciennes, presque dépourvues d'éléments nutritifs, et de plus assez fortement antiseptiques par les produits de la fermentation, le bacille arrive parfois en s'épuisant et en épuisant progressivement ses tissus, à former des spores, encore douées d'une vitalité et d'une résistance suffisantes, bien qu'incapables de recommencer une vie aussi pénible que celle qui leur a donné naissance, mais n'ayant besoin que de rencontrer un milieu favorable pour se développer et assurer la perpétuité de l'espèce. A ce sujet, tous les faits rapportés dans l'étude du ferment des vins amers, s'appliquent à celui que nous avons isolé de l'eau.

En ce qui concerne les bacilles *coli* et *typhique*, nous devons rappeler que la sporulation admise par certains auteurs a été contestée par d'autres.

d) *Aérobiose* ou *Anaérobiose*. — Comme pour les précédents, l'oxygène favorise son développement ; mais il végète en son absence : c'est un *anaérobie facultatif*.

e) *Vitalité*.

1° Conditions de température et durée de conservation.

Comme les bacilles *coli*, *typhique* et *paratyphiques*, il est très résistant dans les conditions de vie ordinaires. L'examen d'une culture âgée de six mois, en milieu minéral glycérimé

ne contenant pas d'autre azote alimentaire que de l'azote ammoniacal, nous l'a montré encore mobile, apparemment aussi robuste et aussi apte au réensemencement que le ferment prélevé dans une culture jeune.

Comme eux, il est également peu exigeant au point de vue de la température : il croit déjà vers 10° et se cultive bien entre 25° et 37°; la température *optima* pour une évolution rapide est comprise entre 30° et 35°; sa végétation s'arrête vers 48°.

Il est relativement résistant au froid et à la chaleur. La congélation prolongée de l'eau qui lui sert d'habitat ne le fait pas périr ; ses éléments sont tués après exposition d'une minute à la chaleur humide à 80° et au bout de cinq minutes à 60° : cette tolérance vis-à-vis de la chaleur humide, identique à celle du *Bacillus amaracrylus*, est semblable à celle du colibacille et nettement supérieure à celle du bacille typhique.

Il convient d'ajouter que si ces conditions de température suffisent à immobiliser, à rendre inertes, en un mot à tuer les cellules végétatives, elles ne produisent pas toujours la stérilisation de la culture, en raison de la faculté de formation de spores dans certaines circonstances d'existence difficile, anormale ; germes qui supportent facilement une température plus élevée. En particulier, une culture ancienne peut parfois manifester encore des propriétés reproductives, fertilisantes, après avoir été maintenue à la température de 80° pendant une durée de dix à quinze minutes.

Enfin, les spores soumises à la dessiccation et à une chaleur sèche de 100°, conservent encore leur faculté germinative : elles sont également très résistantes à l'action du temps.

## 2° Action des antiseptiques et influence des substances paralysantes nées ou introduites dans les milieux de culture.

Comme ceux auxquels nous le comparons, la résistance de ce bacille aux antiseptiques paraît être moyenne. Le bichlorure de mercure à la dose de un millième, l'acide phénique en solution à 10 p. 1000, le tuent en moins d'une heure. A ce sujet, il convient de rappeler que malgré la présence de l'antiseptique et la température de 42°, le déve-

loppement de ce microbe se fait bien et relativement vite en bouillon phéniqué à 1 p. 1000, le milieu étant déjà trouble au bout de douze heures. Comme le bacille d'Eberth et le colibacille, il se développe encore bien en présence d'une proportion d'acide phénique supérieure à 1 p. 1000, notamment à la dose de 1.25 p. 1000. L'acide chlorhydrique en solution de 1 à 3 p. 1000, le tue assez rapidement.

En ce qui concerne l'influence d'autres substances antiseptiques ou paralysantes, il était intéressant de comparer encore la résistance de ce bacille retiré de l'eau avec celle du bacille isolé d'un vin amer. En suivant la méthode employée pour ce dernier, nous avons reconnu que les doses *minima* des substances suivantes : alcool ; crème de tartre ; acides tartrique, formique, acétique, propionique, butyrique, acrylique, lactique, succinique ; soude, potasse ; nitrites ; tannin ; aldéhydes acrylique et hydracrylique ; glycérine, capables d'arrêter la multiplication cellulaire et la fermentation étaient très sensiblement voisines de celles que nous avons délimitées dans l'étude du *Bacillus amaracrylus*.

f) *Virulence*. — Contrairement au *colibacille* et surtout aux bacilles *typhique* et *paratyphiques*, ce microbe ne paraît pas pathogène. Du moins, l'inoculation au cobaye de cultures très riches dans le bouillon, soit par voie sous-cutanée, soit par voie intra-péritonéale, n'a pas été suivie de troubles nettement apparents dans la santé de l'animal. Nous avons déjà observé une semblable innocuité pour le bacille de l'amertume des vins.

g) *Réaction à l'égard des sérums*. — *Agglutination*. — Ce bacille de l'eau peut être agglutiné dans certaines conditions entièrement comparables à celles que nous avons observées pour le *Bacillus amaracrylus*.

1° Le sérum provenant d'un animal inoculé avec ce microbe, l'agglutine facilement.

2° Le sérum normal, humain ou animal, ne l'agglutine pas, ou rarement et à un taux très peu élevé.

3° Le sérum des typhiques et des paratyphiques ne l'agglutine pas.

B. — CARACTÈRES DES CULTURES DANS LES MILIEUX USUELS

Le microbe que nous étudions, comme ceux auxquels nous le comparons, se cultive aisément sur tous les milieux habituels, artificiels ou naturels, liquides ou solides.

CULTURES SUR PLAQUES DE GÉLATINE. — Les colonies sont tardives : avec un milieu nutritif contenant cette substance à la concentration habituelle, elles apparaissent en quatre à cinq jours à une température d'environ 20° et sont minuscules, arrondies en forme de point, de diamètre souvent inférieur à un demi millimètre et dépassant rarement un millimètre dans les colonies âgées.

Dans les mêmes conditions, l'apparition des colonies des bacilles *coli*, *typhique* et *paratyphiques* est beaucoup plus rapide et leurs dimensions sont plus grandes : Comme avec ces microbes, la gélatine n'est jamais *liquéfiée*.

CULTURES SUR GÉLOSE. — Avec un tel substratum, et surtout sur gélose glycinée, la végétation à la température de 37° est rapide et abondante. Après douze heures, la strie d'inoculation est déjà recouverte d'un voile et on obtient ainsi au bout de quelques jours une assez riche culture, blanche, d'aspect crémeux et opaque, analogue à celle que produit chacun des microbes précédents.

CULTURES SUR POMME DE TERRE. — Pas de développement apparent, mais à l'examen microscopique, la multiplication est évidente. Sur ce milieu, le *colibacille* et le *paratyphique B* se développent d'ordinaire abondamment, tandis que le bacille *typhique* et le *paratyphique A* donnent des cultures minimes.

CULTURES DANS LE BOUILLON. — a) *Bouillon ordinaire*. — Le développement est très rapide : le trouble est déjà bien visible au bout de six heures à 37°. En agitant le tube et en examinant par transparence, on voit se former dans le liquide des ondulations qui lui donnent un aspect chatoyant très net. Par le repos, il se rassemble un sédiment blanc pulvérulent. Il ne se forme aucun voile à la surface, ni agglomération floconneuse dans l'intérieur du liquide. La culture reste inodore.

Ces caractères ressemblent à ceux que l'on observe dans les cultures du bacille *typhique* et diffèrent de ceux présentés



par le *colibacille*, au moins quant au voile pelliculaire qu'il forme à la surface des cultures et à l'odeur souvent fétide, fécaloïde, qu'elles exhalent.

b) *Bouillon phéniqué*. — En bouillon peptoné et phéniqué et dans les mêmes conditions de concentration et de température, le bacille que nous étudions pousse aussi bien que ceux auxquels nous le comparons. En outre, dans ces circonstances, il subit dans sa forme et sa mobilité des variations analogues, déjà signalées.

CULTURES DANS LE LAIT. — Comme pour les bacilles précédents, le lait est un excellent milieu de culture pour celui que nous étudions : il y pullule abondamment à une température convenable et produit rapidement la coagulation par formation d'acide lactique. Cette propriété coagulante le rapproche du *bacillus coli communis* et le distingue des bacilles *typhique* et *paratyphiques* qui, malgré une végétation abondante, n'apportent pas de changement appréciable dans l'aspect du liquide, ne le coagulent pas.

CULTURES DANS LES MILIEUX COLORÉS. — a) *En milieu lactosé tournesolé* (lait, bouillon ou gélose). — La production d'acide lactique fait virer rapidement le tournesol au rouge. Cette propriété rapproche le microbe du *colibacille* et le distingue des bacilles *typhique* et *paratyphiques* qui ne modifient pas sensiblement la coloration des milieux lactosés en raison de leur incapacité à produire la fermentation lactique du sucre de lait.

b) *En milieu peptoné, salé et glucosé, additionné de rouge neutre*. — Le bacille produit une réduction progressive assez lente de la matière colorante avec virage au rouge orangé mais sans fluorescence notablement accusée.

C'est encore là un caractère différentiel avec le bacille *typhique* et d'analogie avec le *colibacille*, au moins en ce qui concerne les types de ce genre qui ne réagissent que modérément sur le rouge neutre. Ajoutons aussi que cette réaction constitue une ressemblance avec les bacilles *paratyphiques* qui, d'ordinaire, et surtout le B, provoquent la décoloration du rouge neutre, avec fluorescence jaune verdâtre pâle du milieu.

c) *En milieu d'Endo ou de Drigalski*. — Comme le *colibacille*, et en vertu de son analogie d'action sur le lactose,

sucres entrant dans la constitution de ces milieux, le microbe que nous étudions, végétant sur eux, y fournit des colonies rouges, tandis que dans les mêmes conditions, les bacilles *typhique* et *paratyphiques*, qui n'attaquent pas le lactose, donnent des colonies incolores.

CULTURES DANS LES MILIEUX MÉTALLIQUES. — Sur gélose additionnée de sous-acétate de plomb à 1 p. 500, la culture ne noircit pas. C'est un caractère distinctif des bacilles *typhique* et *paratyphique* B.

## CARACTÈRES BIOCHIMIQUES

### I. — Action sur les matières azotées

1° ACTION SUR LES SUBSTANCES ALBUMINOÏDES. — Le bacille que nous avons isolé de l'eau ne paraît pas exercer d'action bien marquée sur les matières protéiques. Nous avons déjà fait connaître qu'il ne liquéfie pas la gélatine et c'est là un caractère commun avec ceux auxquels nous le comparons. Il coagule la caséine du lait par formation d'acide lactique, mais cette substance ne semble pas autrement modifiée : nous venons d'utiliser cette propriété coagulante dans notre étude comparative. Il est sans action sur l'albumine de l'œuf et ne secrète donc pas de ferments protéolytiques, pepsine ou trypsine.

Cette indifférence à l'égard des matières albuminoïdes proprement dites, non transformées par hydrolyse, est à rapprocher de celle des bacilles auxquels nous le comparons, vis-à-vis des mêmes substances.

Dans les milieux additionnés de peptone, ce microbe ne produit pas d'indol, même après un long temps, mais il donne naissance à un peu d'ammoniaque, absolument comme le *Bacillus amaracrylus*.

Cette absence de production d'indol le rapproche des bacilles *typhique* et *paratyphiques* et le distingue du *Bacillus coli communis* : à ce sujet, il convient cependant de rappeler qu'il existe des types de colibacilles qui, placés dans les meilleures conditions ne produisent jamais la moindre trace d'indol : de ces espèces on a fait une variété, *Bacillus coli communis*, variété *anindolicus* ; la distinction précédente ne peut donc être absolue.

Pour cette recherche de l'indol et de l'ammoniaque, nous

avons utilisé la technique indiquée dans la première partie de notre travail. La proportion d'ammoniaque engendrée par le bacille aux dépens de la peptone, paraît être toujours faible : dans nos cultures, la quantité qui subsiste varie entre 2 et 4 milligrammes, en  $\text{NH}^3$ , par litre.

2° ACTION SUR LES NITRATES. — *Recherche des nitrites et de l'azote. Estimation du pouvoir dénitrifiant.* — A l'égard des nitrates, le *colibacille* et le bacille *typhique* se comportent comme des agents *dénitrifiants* ; leur culture en bouillon ordinaire nitraté dégage de l'azote en passant par le stade nitreux : ce dégagement d'azote s'opère également, et est aussi prononcé, en remplaçant dans la culture le nitrate par le nitrite correspondant.

Le microbe que nous étudions, ensemencé, d'une part, dans une solution de peptone à 1 pour 100, additionnée de 1 pour 100 de nitrate de potasse pur, et d'autre part, dans un milieu semblable où la solution de peptone est remplacée par du bouillon ordinaire, produit également la réduction du nitrate en nitrite dans chacun des deux milieux, et en outre avec libération d'une petite quantité d'azote dans celui à base de bouillon ordinaire.

Après une semaine de culture à 37°, le dosage du nitrite formé dans la solution de peptone nitratée nous a donné 0 gr. 037, soit 3 7 de nitrite pour 100 de nitrate.

Comme le *Bacillus amaracrylus*, et comme les bacilles d'*Escherisch* et d'*Eberth*, ce microbe des eaux rentre donc dans la catégorie des *ferments dénitrifiants indirects*. Toutefois, et de même qu'avec le bacille des vins amers, nous n'avons pas obtenu de libération d'azote, directement à partir du nitrite de potasse en solution à titre convenable dans le bouillon : nous avons reconnu aussi que ce microbe est plus sensible à l'action toxique des nitrites en général, que ceux auxquels nous le comparons présentement.

3° ACTION SUR L'URÉE. — Ensemencé dans le milieu de Miquel, solution d'urée à 2 pour 100 dans l'eau peptonée à 1 pour 100, ce microbe ne produit pas la fermentation ammoniacale de la carbamide : il ne sécrète donc pas d'uréase. Ce caractère le rapproche du bacille *typhique* et le distingue du *colibacille*.

## II. — Action sur les alcools polyatomiques et les hydrates de carbone.

1° ACTION SUR LES ALCOOLS POLYATOMIQUES. — Ainsi que nous l'avons vu, le bacille fait fermenter énergiquement la glycérine et la mannite, substances vis-à-vis desquelles il se comporte en outre comme un *ferment lactique*. Ce pouvoir fermentescible le rapproche du *colibacille*, au moins de la plupart de ses variétés, et le distingue du bacille *typhique* qui n'agit pas sur ces substances et même des bacilles *paratyphiques* qui ne les transforment que faiblement et sans production de gaz.

Cependant, en ce qui concerne la fermentation de la glycérine par le *Bacillus coli communis*, et au moins avec les trois variétés de ce genre qui ont servi à nos expériences, l'une venant de la collection de l'Institut Pasteur, les deux autres provenant de selles normales de l'homme et d'une eau de rivière, nous n'avons jamais constaté la production d'aldéhyde *acrylique* : or, nous savons que la formation de ce produit de déshydratation de la glycérine est une *caractéristique* importante pour le ferment soumis à notre étude. Cette particularité différentielle rétrécit donc singulièrement le lien de rapprochement que nous venons de signaler entre le microbe dont nous nous occupons et le *Bacillus coli communis* : elle suffirait même à les distinguer complètement et définitivement si nous n'étions pas informés de la variabilité extrême que montre le *colibacille* dans la plupart des propriétés que nous lui connaissons. Néanmoins, nous lui conserverons un rôle prépondérant parmi les caractères distinctifs de ces deux microbes.

2° ACTION SUR LES HYDRATES DE CARBONE. — Le bacille attaque énergiquement les sucres et nous avons fait connaître dans ce qui précède les résultats détaillés de son action sur le glucose et le saccharose, parmi lesquels l'acide lactique figure en quantité largement prédominante.

Cette propriété le rapproche du *colibacille*, au moins de la plupart de ses variétés et en fait comme celui-ci, un *ferment lactique* : il convient cependant de rappeler ici que la propriété de faire fermenter le saccharose est une exception chez le *colibacille* (1). Ce caractère de similitude s'étend

(1) L. GRIMBERT. — Action du colibacille sur le lactose et le saccharose. — *C. R. Société de Biologie*, p. 684 ; 1896.

encore, quoique à un degré moindre, aux bacilles *paratyphiques*, dont les deux types *A* et *B* font fermenter vigoureusement le glucose, le lévulose, le galactose et le maltose, sans agir cependant sur le saccharose et le lactose. Au contraire, cette propriété l'éloigne du bacille *typhique* qui, d'une façon générale, n'agit que médiocrement sur les substances sucrées, et paraît même respecter dans leur intégralité le saccharose et le lactose.

*Production de gaz.* — La fermentation des alcools polyatomiques et des hydrates de carbone par ce microbe est accompagnée d'un notable dégagement de gaz carbonique et surtout d'hydrogène, lequel figure pour plus de la moitié et moins des deux tiers dans le volume total du mélange gazeux fourni par les sucres.

Dans les mêmes circonstances, le *colibacille* donne, lui aussi, principalement de l'hydrogène, presque les deux tiers du volume total, de l'anhydride carbonique pour un autre tiers, et un peu de gaz des marais.

Si cette production gazeuse, qualitative et même quantitative, d'hydrogène et de gaz carbonique, rapproche notre microbe du *colibacille*, et aussi, mais à un degré moindre, des bacilles *paratyphiques*, elle le distingue, au contraire, très nettement du bacille d'*Eberth* qui fermente les sucres sans dégagement gazeux appréciable.

#### CONCLUSIONS DE CETTE ÉTUDE COMPARATIVE

I. — L'ensemble des caractères morphologiques, biologiques, cultureux et biochimiques du bacille isolé de l'eau, comparés à ceux du *Bacillus amaracrylus* retiré d'un vin amer, affirme une étroite ressemblance entre ces deux êtres.

II. — Ce microbe des eaux présente des analogies et des différences avec le *colibacille* et les bacilles *typhique* et *paratyphiques*.

Comme eux, il végète en bouillon phéniqué à la concentration de 1 pour 1000 et à la température de 42°.

Par son caractère de *ferment lactique*, par l'action sur les milieux colorés, soit au tournesol, soit au rouge neutre, ou incolores, comme celui d'Endo à la rosaniline, il se rapproche du bacille d'*Escherisch* et se distingue du bacille d'*Eberth* ou même des *paratyphiques*.



L'absence de production d'*indol* conduirait à un résultat inverse de comparaison, s'il n'était établi que des types de colibacilles, de la variété *anindolicus*, sont incapables d'engendrer cette substance.

Deux propriétés fondamentales, l'une biologique, l'autre chimique, différencient ce microbe de ceux auxquels nous le comparons présentement, et qui sont, au moins l'un d'eux, des hôtes encore trop fréquents des eaux.

*Propriété biologique.* — Il n'est pas pathogène.

*Propriété chimique.* — Il produit la fermentation acrylique de la glycérine.

#### ESSAI DE CLASSIFICATION DE CE BACILLE

Alors que le bacille *typhique* offre une constance remarquable dans ses principaux caractères, ce qui fait qu'on peut le considérer comme un type spécifique, bien nettement différencié, le *colibacille* au contraire, par la variabilité de ses propriétés, paraît être un centre microbien d'où rayonnent dans diverses directions des types plus ou moins aberrants, qu'une étude isolée peut faire considérer comme des espèces distinctes, mais qui peuvent aussi être ramenés à leur centre d'origine par une étude comparative approfondie, de manière à constituer un groupe assez naturel.

À tous ces microbes présentant l'ensemble des attributs du colibacille, mais se séparant de l'espèce type par un ou deux caractères essentiels, on donne généralement le nom de *Paracolibacilles*, d'après Gilbert et Lion (1). Les types les plus répandus sont les suivants : 1° type immobile ; 2° type ne donnant pas d'indol ; 3° type immobile et ne donnant pas d'indol ; 4° type ne réduisant pas le rouge neutre ; 5° type ne faisant pas fermenter le lactose.

Pour ces espèces, les vraies bases de classification résident dans leurs caractères microscopiques et dans leurs caractères de culture, bien que les réactions culturales puissent être encore assez souvent atypiques à certains égards.

Les assez nombreux caractères de ressemblance relevés dans son étude, entre ce microbe de l'eau et le *colibacille*, permettent-ils de le ranger dans ce groupe des *Paracolibacilles* ?

(1) GILBERT et LION. — Contribution à l'étude des Bactéries intestinales. — *Semaine Médicale*, p. 130 ; 1893.

Nous ne le pensons pas, car, par ailleurs, les caractères différentiels sont encore trop fréquents, et certains ont trop d'importance, pour en autoriser l'introduction dans un groupe déjà trop vaste, et qu'il convient de limiter si on ne veut en faire un *caput mortuum* de la microbiologie.

Bien que la variété des formes et des fonctions ne soit pas toujours en contradiction avec l'unité de l'espèce, nous inclinons néanmoins à considérer ce microbe de l'eau comme un type spécial, *non pathogène*, nettement différencié, spécifiquement défini par la propriété qu'il possède de *déshydrater* la glycérine ; caractère fondamental qui doit servir de base à sa classification.

---

### Application de cette étude à l'Analyse des eaux

---

Si le bacille *coli communis* existe fréquemment dans l'eau, celui que nous étudions en est un hôte plus banal encore : aussi, le rencontre-t-on assez couramment dans la pratique de l'analyse bactériologique des eaux.

Dans la partie qualitative de cette analyse, en vue de l'identification des germes, on observe souvent un bacille ayant une morphologie semblable à la sienne : comme lui, plus ou moins mobile ; se décolorant plus ou moins facilement par la méthode de Gram ; capable de se développer en bouillon phéniqué à 1 pour 1000, à la température de 42° ; ne liquéfiant pas la gélatine et engendrant sur ce milieu des colonies minuscules ; ne donnant pas d'indol ; réduisant modérément le rouge neutre ; coagulant le lait et faisant virer au rouge son lacto-sérum tournesolé ; et qui, réensemencé dans le bouillon lactosé, même non carbonaté, y produit un dégagement gazeux d'hydrogène et d'anhydride carbonique : en un mot, tous caractères d'un microbe appartenant à celui qui fait l'objet de cette étude et ne permettant guère de le distinguer d'un *paracolibacille*, au moins sans plus ample contrôle. Généralement, ce microbe est considéré par les analystes comme un représentant de ce vaste groupe et de la variété *anindolicus*.

Comme complément d'information, chaque fois qu'il nous a été donné de constater les faits précédents au cours d'une analyse d'eau, il a été extrêmement intéressant pour nous de savoir si le bacille ainsi rencontré était capable, comme celui que nous étudions et de même origine, de transformer la glycérine et d'en produire la fermentation acrylique par déshydratation.

Cette question posée nous a conduit à présenter, sous le nom de *glycéro-réaction*, un nouveau caractère différentiel dans l'étude des espèces microbiennes, notamment et surtout celles peuplant les eaux. L'emploi de cette réaction dans la pratique de l'analyse bactériologique de l'eau aura pour résultat, chaque fois qu'elle sera positive, d'achever de caractériser le microbe observé en l'identifiant à celui de cette étude, tous les autres caractères précités ayant été, eux-mêmes, préalablement vérifiés.

Il convient de remarquer qu'il s'agit ici d'une action *biochimique*, par conséquent fondamentale : de plus exceptionnelle, par sa voie de déshydratation, par conséquent capitale ; enfin, au regard de la glycérine, cette fonction physiologique peut paraître *spécifique*, en raison de cette exceptionnalité elle-même et des conclusions générales de notre étude, relatives à l'identification de deux êtres microbiens jouissant de cette faculté déshydratante, issus en apparence de deux milieux différents, mais dont l'un, le vin, sert toujours d'habitat à l'autre, l'eau, à un taux de dilution plus ou moins faible, cependant largement suffisant pour l'apport des germes.

Son introduction dans le domaine de la bactériologie contribuera à reculer encore les limites de la différenciation des espèces microbiennes. Déjà, parmi les méthodes culturales de séparation des bactéries, l'association d'un antiseptique et d'une température relativement élevée, réalisée dans le procédé de M. Vincent, par culture en bouillon phéniqué à 1 pour 1000, à la température de 41°.5 à 42°, et si couramment utilisée aujourd'hui, a permis de faire une sélection entre les microbes, en écartant un grand nombre d'espèces qui ne peuvent croître dans ces conditions, en particulier les principales espèces liquéfiantes qui détruisent souvent et rapidement les cultures sur plaques. Mais les microbes qui peuvent végéter ainsi sont encore nombreux, et parmi eux se trouvent notamment : d'une part, le *colibacille* et ses

variétés, le bacille *typhique* et ses congénères, les *paratyphiques* ; d'autre part, les bacilles que nous avons isolés d'un vin amer et de l'eau.

Si, pour ces microbes, relativement résistants, l'association de l'antiseptique et de la température constitue ce que nous pouvons appeler un *réactif général* les classant tous, et à ce point de vue, dans le même groupe, la *glycéro-réaction*, négative pour les premiers, positive pour les seconds, interviendra vis-à-vis d'eux comme un *réactif secondaire* achevant de les différencier, au moins en permettant de les classer par dichotomie en deux sous-groupes.

Cette réaction, lorsqu'elle sera positive, aura ainsi l'avantage, à notre avis du moins, basé sur ce fait que le *colibacille* ne jouit pas de la propriété de déshydrater la glycérine, d'éviter le classement d'un microbe d'allures semblables aux siennes, mais possédant cette faculté de soustraction d'eau, dans le groupe déjà si vaste des *paracolibacilles*, lequel sert trop souvent de refuge à notre ignorance.

Selon nos conclusions précédemment formulées, elle permettra en outre, tous les caractères précités étant vérifiés et satisfaits, de *nommer* le microbe ainsi rencontré en l'identifiant avec le *Bacillus amaracrylus*, sinon l'espèce type, au moins une variété.

### Glycéro-réaction.

Ce moyen de diagnose bactérienne repose sur la propriété que possède un microbe comme celui que nous avons isolé, soit d'un vin amer, soit de l'eau, de *produire la fermentation de la glycérine en donnant naissance à de l'acroléine*.

Sa mise en œuvre nécessite un milieu de culture glycé-  
riné et un réactif permettant de reconnaître facilement le produit de déshydratation de cette substance.

MILIEUX DE CULTURE. — On prépare en provision les deux milieux liquides de composition suivante :

|                                | I        | II       |
|--------------------------------|----------|----------|
| Sulfate d'ammoniaque . . . . . | 4 gr. 70 | 4 gr. 70 |
| Phosphate monopotassique. . .  | 0 gr. 75 | 0 gr. 75 |
| Sulfate de magnésie . . . . .  | 0 gr. 10 | 0 gr. 10 |
| Peptone . . . . .              | Néant    | 3 gr.    |
| Glycérine . . . . .            | 20 gr.   | 20 gr.   |
| Eau ordinaire . . . . .        | Un litre | Un litre |

le second s'obtenant avec le premier par simple addition de peptone.

On en remplit aux deux tiers des flacons d'environ un dixième de litre de capacité, bouchant à l'émeri; on obture avec du coton, le bouchon étant repéré avec le flacon ou attaché à son goulot et ne devant servir pour la fermeture qu'après l'ensemencement : conjointement on répartit les mêmes liquides dans de petits ballons, pour le remplissage des flacons après stérilisation et au moment du besoin : on chauffe à l'autoclave à 120° pendant quinze à vingt minutes ; on laisse les liquides se refroidir et s'aérer à nouveau.

RÉACTIFS. — L'acroléine est décelée par le réactif *protéique acide*, solution d'albumine dans l'acide chlorhydrique nitreux, dont nous avons donné la composition au début de ce travail.

Conjointement, mais simplement pour reconnaître rapidement la formation d'un corps à fonction aldéhydique, on peut utiliser le réactif de Schiff au bisulfite de rosaniline : son emploi est même avantageux et doit logiquement précéder celui du réactif *protéique acide*.

La formule suivante, due à Leys, donne un réactif très sensible, mais assez long à se décolorer :

|                                                    |                     |
|----------------------------------------------------|---------------------|
| Solution aqueuse de fuchsine à 1 gramme par litre. | 1.000 <sup>cc</sup> |
| Bisulfite de soude à 30° Baumé.....                | 10 <sup>cc</sup>    |
| Acide chlorhydrique pur et concentré.....          | 10 <sup>cc</sup>    |

On verse le bisulfite dans la solution de fuchsine et, quand une forte atténuation de la coloration s'est produite, on ajoute l'acide : le liquide prend une teinte brunâtre et, au bout de quelques jours, devient complètement incolore.

Il est à remarquer que ce réactif donne une coloration rose plus ou moins accentuée avec la plupart des peptones en solutions suffisamment riches ; coloration vraisemblablement due à la présence dans ce complexe protéique d'un corps à fonction aldéhydique, comme la *glucosamine* ; mais, après quelques jours de culture, le microbe l'ayant consommé, la coloration ne se produit plus ou est très atténuée. Notre milieu peptoné à concentration faible ne la donne pas, même avant culture.

RECHERCHE DE L'ACROLÉINE. — On suit la technique opératoire indiquée au début de ce travail.

Pour des proportions infinitésimales d'acroléine, on accroît encore la sensibilité de la réaction en employant de l'acide chlorhydrique,



nitreux au demi,  $\text{HCl } \frac{a}{2}$ , et en réduisant également de moitié, c'est-à-dire à un  $1/2$  centimètre cube, la quantité d'eau albumineuse. En mettant ainsi en rapport, en concordance quantitative, les trois substances fondamentales de la réaction colorée : *aldéhyde acrylique*, *acide azoteux*, *albumine* ou mieux *tryptophane*, résultant de la dissociation de sa molécule par l'acide chlorhydrique, on évite : d'une part, l'action nuisible de l'acide azoteux, oxydant, dont un excès peut détruire la coloration qu'il a primitivement contribué à former ; d'autre part, la production d'une légère coloration violacée résultant de l'action de l'acide chlorhydrique concentré sur l'albumine en solution elle-même suffisamment riche, et qui peut rendre moins nette la coloration recherchée.

Dans tous nos essais, la production de l'acroléine a toujours été suffisante pour permettre sa reconnaissance à l'aide du réactif à sa concentration première.

Enfin, pour constater la formation primitive de la teinte verte, lorsque la teinte bleue doit lui succéder, il est utile d'examiner le liquide de la réaction suivant l'axe du tube et sur fond blanc.

Nous allons nous placer dans le cas d'une analyse d'eau et supposer que l'opérateur en est à la recherche du *colibacille* effectuée suivant la méthode de M. Vincent par ensemencement dans du bouillon de peptone phéniqué, de l'eau examinée, à des dilutions diverses, mais de progression régulière, en vue d'une numération, et maintien des milieux de culture à la température de  $42^{\circ}$ .

Du premier liquide qui s'est troublé, et en suivant la technique de la méthode, c'est-à-dire après un deuxième et au besoin un troisième passage en bouillon de peptone phéniqué et nouveau maintien à l'étuve à  $42^{\circ}$  ; puis repiquage sur bouillon simple, à  $37^{\circ}$ , et enfin réensemencement de cette dernière culture sur plaques de gélatine, on isole des colonies d'un microbe qui, au point de vue morphologique, biologique et biochimique, notamment par sa culture dans le lait, dans le petit lait tournesolé et le bouillon lactosé, dans le bouillon au rouge neutre, dans l'eau peptonée, possède les caractères généraux mentionnés au début de cette application à l'analyse des eaux.

Ce microbe *ne donnant pas d'indol*, n'est pas le *colibacille normal*. Par ses traits de ressemblance avec lui, en particulier par son caractère de *ferment lactique*, mérite-t-il d'être rangé dans le groupe des *paracolibacilles* ? La *glycéro-réaction* doit répondre à cette question en disant : *oui*, si elle est négative ; *non*, si elle est positive ; et, dans ce dernier cas, en achevant de l'identifier avec le *Bacillus amaracrylus*.

## MODE OPÉRATOIRE

A l'aide d'un prélèvement dans la culture en bouillon lactosé, on ensemente, par une goutte, chacun des deux milieux glycérinés : les deux flacons remplis, chacun avec le liquide correspondant d'un ballon, et fermés avec leur bouchon, sont laissés à une température voisine de 20°; par exemple, à même la table du laboratoire en été, ou au voisinage d'un poêle en hiver. Il n'est pas nécessaire que cette température soit invariable; elle peut descendre à 15°, ou même au-dessous, pendant la nuit.

### PREMIÈRE PHASE. — *Fermentation en milieu acide.*

Lorsque le microbe est capable de produire la *glycéro-réaction*, on reconnaît son développement avant quarante-huit heures, et malgré la température relativement basse, dans le milieu peptoné qui devient trouble et entre déjà en effervescence au bout de ce temps. On constate également, mais avec un retard d'environ vingt-quatre heures sur les précédents, les mêmes phénomènes de culture et de réaction dans le milieu minéral, lesquels, et notamment le dégagement gazeux, sont en outre moins accentués que dans le milieu peptoné.

A partir de l'apparition de ces phénomènes, c'est-à-dire vers le troisième et le quatrième jour, il convient de suivre, matin et soir, les modifications chimiques survenues dans chacune des cultures, à l'aide du réactif de Schiff, en vue de révéler la présence de la fonction aldéhyde. A cet effet, on prélève dans un tube à essai environ 5 centimètres cubes de liquide, auquel on ajoute moitié de son volume du réactif: on mélange et on examine sur fond blanc, à diverses reprises, pendant un quart d'heure, le développement de la coloration n'étant que progressif.

Très souvent, au cours de cette première phase, le réactif de Schiff n'accuse pas la présence d'un aldéhyde dans le milieu peptoné, ou bien la recoloration n'est que légèrement rose. Généralement, l'existence d'un aldéhyde est révélée dans le milieu minéral au début du quatrième jour.

Dès que sa présence a été reconnue, on suit ses variations de six heures en six heures à l'aide du réactif; on constate que sa proportion va en croissant, passe par un maximum, à l'époque duquel la recoloration de la fuchsine est souvent intense, puis décroît ensuite progressivement et assez rapidement jusqu'à disparition complète, au moins dans le milieu peptoné. En soumettant parallèlement le liquide à l'essai par le réactif *protéique acide*, on y met en évidence l'acroléine par la formation d'une coloration bleue, vert-bleuâtre, ou même verte lorsque sa proportion au moment de l'essai est relativement notable et voisine du maximum de cet antiseptique compatible avec la vie du ferment.

### DEUXIÈME PHASE. — *Fermentation en milieu neutre.*

Lorsque, surtout par suite de l'acidité née dans la liqueur, la fermentation s'est arrêtée, que l'effervescence a cessé et que l'aldéhyde

acrylique primitivement formé a disparu, en totalité ou en partie, en subissant ses métamorphoses variées d'ordre chimique et biochimique, ce qui n'arrive généralement, pour le milieu minéral, que vers le septième jour de l'expérience, on ajoute dans chaque milieu, à ce moment seulement, c'est-à-dire après la *durée d'une semaine* pour la première phase, environ un gramme de carbonate de chaux préalablement stérilisé par chauffage dans un petit tube à essai : on agite vivement pour produire la neutralisation et on soumet à nouveau les deux milieux aux conditions de culture précédentes.

La fermentation de la glycérine non transformée recommence alors ; on la suit de six heures en six heures avec le réactif de Schiff, en opérant comme précédemment. On obtient ainsi, généralement en moins de vingt-quatre heures, quelquefois dès le premier essai, la recoloration de la fuchsine, même avec la culture en milieu peptoné : habituellement, la coloration rouge violet est déjà très accentuée au bout de vingt-quatre heures, avec l'une et l'autre culture, et peut être reproduite pendant plusieurs jours, quelquefois plusieurs semaines. Pendant cette période, et de préférence au moment où on juge qu'elle a atteint son intensité maxima, le liquide traité par le réactif *protéique acide* accuse à nouveau la présence de l'acroléine.

#### OBSERVATIONS

I. — Ordinairement, nous avons utilisé seulement le premier milieu, purement minéral et glycéricé, qui permet de reconnaître la formation de l'aldéhyde acrylique dès la première phase de la fermentation en milieu acide.

Lorsque, dans ces conditions de moindre alimentation, où il ne reçoit comme azote que de l'azote minéral, le microbe observé satisfait à la *glycéro-réaction*, cette faculté contribue encore à l'identifier avec le *Bacillus amaracrylus*, de même origine.

Le milieu peptoné est moins avantageux ou plutôt moins expéditif, car, au cours de cette première phase, et en raison de l'activité physiologique plus grande du microbe, résultant d'une nutrition meilleure, les métamorphoses biochimiques de l'acroléine formée y sont aussi beaucoup plus rapides ; en sorte que la production de cette *substance révélatrice de la glycéro-réaction* peut passer inaperçue.

Cependant, dans la seconde phase de la fermentation, ce milieu intervient très efficacement pour montrer aussi la formation de l'acroléine, dont la révélation par les réactifs est d'autant plus nette que l'addition de l'agent de neutralisation a été faite à un moment plus opportun. En particulier, et bien que la fermentation initiale dans ce milieu s'ar-

rête dès le quatrième ou cinquième jour de culture, il convient de ne réaliser la seconde phase qu'au début de la deuxième semaine de l'expérience ; on obtient ainsi, généralement dès le deuxième jour de la reprise du travail fermentaire, une richesse relativement grande et relativement persistante du liquide en aldéhyde acrylique, avec recoloration violette intense de la fuchsine et coloration verte par le réactif *protéique acide*.

Ajoutons que ces conditions d'exécution de cette seconde phase de fermentation effectuée dans un milieu encore suffisamment nutritif, mais alimentant un être à vitalité amoindrie par son séjour en milieu acide sont d'ailleurs comparables à celles réalisées primitivement dans le milieu de disette purement minéral.

En un mot, le milieu minéral solutionne le problème aussi bien dans l'un des modes de fermentation que dans l'autre : le milieu peptoné fournit sa réponse la plus probante dans la phase de fermentation en liqueur neutre succédant en temps opportun à celle en liqueur acide.

Pratiquement, si ce milieu minéral suffit à révéler la *glycéro-réaction*, théoriquement, chacun d'eux est utile pour montrer dans la fonction physiologique du ferment à l'égard de la glycérine, l'existence de la double faculté de *formation* et de *destruction* de son produit de déshydratation, l'acroléine : faculté double, dont la constatation met aussitôt en relief l'importance du rôle joué par l'aldéhyde acrylique dans cette transformation biologique de la glycérine.

En suivant attentivement ces expériences de fermentation, réactifs en main, comme nous l'avons fait des centaines de fois, on reconnaît : que ces deux propriétés antagonistes se font *presque équilibre* dans un milieu peptoné neuf, acide ou neutre ; que la faculté de *formation* est *supérieure* à celle de *destruction* au début de ce même travail effectué en milieu neutre par le microbe préalablement et suffisamment affaibli par son séjour dans un milieu peptoné ancien au contact des acides qu'il a engendrés, et aussi, lorsqu'on lui impose primitivement, ou secondairement après neutralisation, de végéter dans un milieu de relative souffrance, comme le milieu minéral glycérimé qui, en raison de sa plus prompt réponse, demeure ainsi *celui de choix pour l'essai de la glycéro-réaction*.

Ajoutons que nous avons observé maintes fois la mani-



festation de ces propriétés successives et opposées dans l'étude de la fonction physiologique du *Bacillus amara-crylus* à l'égard de la glycérine : leur reproduction au cours de l'étude d'un microbe des eaux, à caractères semblables, contribuera encore à l'identifier avec cette espèce.

Si, pour les raisons précédentes, nous accordons la préférence au milieu minéral glycérimé, c'est également pour stabiliser en quelque sorte l'acroléine, pour rendre plus favorables les conditions de sa visibilité, que nous avons choisi comme *optima*, après vérifications comparatives, une température de culture relativement basse, moins propre aux manifestations chimiques et biologiques destructives, cependant suffisante pour assurer la production fermentaire de l'acroléine, et afin de préserver autant que possible cet aldéhyde particulièrement fragile contre ses trois principaux ennemis, dans les circonstances actuelles : l'eau, les acides et le microbe.

II. — En étudiant l'action du *Bacillus amaracrylus* sur la glycérine, nous avons reconnu que sa formation de l'acroléine était précédée de celle d'un autre aldéhyde que nous avons qualifié, expérimentalement et déductivement, comme étant le *propanolal* 1.3 ou aldéhyde *hydracrylique*, produit intermédiaire de déshydratation entre la glycérine et l'aldéhyde acrylique. Très souvent, au cours de nos essais, nous avons eu l'occasion d'observer la même production intermédiaire de la part d'un microbe rencontré au cours d'une analyse d'eau et satisfaisant à la *glycéro-réaction*. Cette reconnaissance a lieu même avec la culture en milieu minéral, lorsque le liquide ne communique au bisulfite de rosaniline qu'une coloration rose : si, à ce moment, on effectue l'essai avec le réactif *protéique acide*, on obtient habituellement une coloration rouge groseille ou rose violacé, analogue à celle que donne l'aldéhyde hydracrylique en solutions très diluées, complètement distincte de la coloration bleue que fournit l'acroléine dans les mêmes conditions. Le réactif de Schiff lui-même annonce cette distinction par la différence de ses colorations : avec la nuance rose dominante pour l'aldéhyde hydracrylique et violette pour l'aldéhyde acrylique.

Cette reconnaissance de la déshydratation *progressive* de la glycérine par un microbe isolé d'une eau, et de caractères



semblables à ceux du *Bacillus amaracrylus*, achèvera de l'identifier avec cette espèce.

En résumé, lorsque la *glycéro-réaction* est positive, son exécution attentivement suivie permet de reconnaître, dans les détails de sa manifestation, plusieurs points fondamentaux de ressemblance avec ceux fournis dans les mêmes circonstances par le *Bacillus amaracrylus*. A elle seule, elle attribue ainsi au microbe observé tout un faisceau de caractères de similitude qui, joints aux autres déjà nombreux et au fait d'une origine commune, autorisent à l'identifier avec cette espèce. En raison de son exceptionnalité, au moins à l'heure actuelle, et jusqu'à la découverte d'un nouvel être jouissant de cette propriété, elle suffirait même à cette identification.

Dans la presque totalité de nos multiples essais de ce genre, expérimentés au cours d'analyses d'eaux, la *glycéro-réaction a été positive* : le microbe observé était bien le *Bacillus amaracrylus*, en espèce ou en variété. Ces résultats de la pratique de l'analyse bactériologique des eaux confirment, par une enquête, sinon plus minutieuse, au moins d'un autre genre, et qui fait ressortir son intérêt à la fois théorique et pratique, notre opinion exprimée, dès le début de l'étude de ce microbe des eaux, par cette phrase : « *La présence dans l'eau d'un ferment figuré capable de déshydrater la glycérine paraît générale.* »

III. — A la suite de ces résultats et de leur conclusion, se pose immédiatement cette question. Si le *Bacillus amaracrylus* est une bactérie banale, contenue dans toutes les eaux, et de plus capable de végéter dans les bouillons phéniqués à température relativement élevée, selon les conditions numériques imposées par la méthode de M. Vincent ; et si, en fait, on l'isole assez fréquemment en suivant cette méthode, au cours d'une analyse d'eau, comment se fait-il que cette opération, ainsi conduite, ne révèle pas toujours sa présence ?

Pour répondre à cette question, il convient de rappeler les faits suivants :

1° La méthode de recherche du *colibacille* par essai de culture en bouillon phéniqué à température relativement haute, est avant tout une méthode de séparation, de différenciation microbienne, fondée sur ce fait d'observation que

le *colibacille* est, parmi les microbes suffisamment résistants pour pouvoir végéter dans un tel milieu de souffrance, celui qui y pullule, en général, le plus rapidement.

Cette méthode est *éliminatoire* à la fois par l'*antiseptique*, par la *température* et par la *durée* de l'essai ; celle-ci est très variable suivant les expérimentateurs et s'étend généralement, de quinze à quarante-huit heures. A l'expiration du délai adopté, lorsque l'examen des cultures ne révèle pas un trouble net et uniforme, on conclut à l'absence de *colibacille*, et on considère comme terminée cette partie de l'analyse : dans le cas contraire, le trouble peut être dû à du *coli*, mais aussi à quelqu'autre microbe, et notamment notre *Bacillus amaracrylus* : c'est alors qu'interviennent les réactions secondaires différentielles, telles que la recherche du pouvoir indogène ; les caractères de culture, en bouillon lactosé ; en bouillon au rouge neutre ; et c'est alors que pourra intervenir aussi et désormais la *glycéroration*.

2° L'eau représente, pour le moins, un *milieu de conservation* assez favorable de la plupart des bactéries qu'elle renferme. Une eau relativement riche en matières organiques, en matières minérales azotées, notamment en nitrates toujours présents, et qui sont à la fois source d'azote et d'oxygène, peut même devenir un véritable *milieu de culture* pour ses bactéries. Dans ce milieu, comme dans toute culture, un même microbe est représenté par des individus de tous âges, appartenant à des générations différentes et comme tels inégalement résistants : transplanté dans un autre milieu, même dans une autre eau, il exigera avant son développement une période d'adaptation ou d'accoutumance plus ou moins longue ; parfois même, il lui arrivera de succomber, surtout si son nouvel habitat lui est hostile, à la fois par l'*antiseptique* et par la *température*, comme l'est, à 42°, le bouillon phéniqué.

Enfin, l'eau dans sa masse, surtout à l'état statique, ne présente une homogénéité, ni chimique, ni biologique : une même espèce microbienne peut s'y trouver très inégalement répartie, à tel point qu'en pratique analytique, et précisément dans la recherche actuelle du *colibacille*, on observe souvent des résultats en apparence anormaux. Il arrive en effet, au cours de cet essai, que certains liquides de culture se troublent, alors que d'autres, cependantensemencés avec

des quantités d'eau plus grandes, restent limpides : ce fait, assez fréquent, s'observe en général avec des eaux où le *colibacille* est suffisamment rare, pour que certaines prises d'ensemencement, même volumineuses, puissent être privées du microbe, disséminé, au contraire, dans d'autres plus petites.

Pour ces raisons principales, tenant : au pouvoir antiseptique et à la température du milieu ; à la durée limitée de l'essai ; à la pullulation admise comme relativement plus rapide du *colibacille*, spécialement visé ; à la valeur vitale et conséquemment reproductive des éléments microbiens d'une eau, en relation directe avec son pouvoir nutritif, entraînant avec elle une période plus ou moins longue d'adaptation nécessitée par le changement du milieu ; et, à la dissémination plus ou moins rare, jamais uniforme, d'une espèce quelconque dans ce liquide, il doit s'ensuivre que cette méthode de triage des espèces microbiennes d'une eau, spécialement adaptée à la recherche du *colibacille*, peut très bien ne pas dévoiler la présence du *Bacillus amara-crylus*, lequel, par contre, lorsqu'il se présentera au milieu phéniqué avec une vitalité suffisante, nécessitant une accoutumance moindre, pourra donner un trouble net, en l'absence du premier et dans le minimum de temps imparti à son développement, quelquefois en un temps plus court.

Ces considérations permettent d'aller plus loin en émettant l'opinion que, sans culture préalable, c'est-à-dire telle qu'on la pratique d'habitude, et même avec le maximum de durée de quarante-huit heures, cette méthode assurément très utile, peut ne pas révéler le *colibacille* dans une eau contenant ses représentants en minime quantité et dans un état de mauvaise conservation, d'affaiblissement tel que tous devront fatalement succomber à leur arrivée dans le milieu phéniqué, si, pour eux tous, son pouvoir bactéricide l'emporte sur son pouvoir alimentaire.

En d'autres termes, alors que nos milieux glycérinés, peptoné ou même purement minéral, sont très propres à nous déceler l'existence du *Bacillus amara-crylus* dans une eau qui les a ensemencés, en donnant des cultures prospères de ce microbe permettant d'assurer ensuite son développement dans le bouillon phéniqué, à 42°, généralement

même en moins de quinze heures ; au contraire, l'ensemencement direct de l'eau dans ce dernier milieu, devra être parfois impuissant à procurer cette multiplication, même après une durée de quarante-huit heures.

La pratique de la culture avec durée indéterminée, dans nos milieux ordinaires, comme le milieu peptoné, réalisable avec plus ou moins de rapidité et de vigueur par la généralité des microbes, constitue en quelque sorte une *épreuve d'examen*, à laquelle tous peuvent être candidats ; tandis que la tentative de culture avec délai, dans le milieu phéniqué, à 42°, doit être considérée comme une *épreuve de concours* où les chances limitées à la fois par la difficulté et par le temps, ne peuvent assurer le succès qu'à certains d'entre eux, choisis parmi les plus forts et les mieux adaptés à l'épreuve ; pour répondre à notre désir, et s'il était possible, elles ne devraient même l'assurer qu'à un seul, le *colibacille*.

Il ne faut jamais oublier, enfin, que si, en bactériologie, les résultats positifs permettent une affirmation absolue, sans restriction aucune, ceux qui sont négatifs ne peuvent qu'autoriser le doute et n'ont, par eux-mêmes, aucune signification.

Cette longue parenthèse étant fermée, avant de clore aussi la discussion qui l'a précédée, et malgré la préférence que nous y avons témoignée au milieu minéral, nous estimons qu'il convient de réaliser *toujours en double* l'essai de la *glycéro-réaction*, en étudiant parallèlement le travail microbien en milieu peptoné et en milieu minéral. Même dans cette application à l'analyse des eaux, à plus forte raison en dehors d'elle, et indépendamment d'avantages précédemment mentionnés, plus spécialement propres à ce milieu peptoné, il peut se présenter une Bactérie, venant de l'eau ou ayant une autre origine, qui jouisse, elle aussi, de la propriété de déshydrater la glycérine, mais sans pouvoir végéter dans un milieu de relative disette, comme l'est notre milieu minéral : la culture en liquide peptoné interviendra alors utilement pour dénoncer à la fois son existence et sa faculté de déshydratation de la glycérine.



**Explication et Comparaison des phénomènes successifs  
de la *Glycéro-réaction* produits par le *Bacillus amaracrylus*,  
originaire de son milieu naturel, l'eau,  
ou venant d'une culture artificielle.**

Lorsqu'on prépare le milieu de culture peptoné et glycé-  
riné avec de l'eau ordinaire et qu'on ne stérilise pas, la  
*glycéro-réaction* due au *Bacillus amaracrylus* normalement  
présent dans l'eau, est généralement *positive* dans la phase  
de fermentation en milieu acide.

Lorsqu'on prélève ce bacille dans l'une de ses cultures, le  
renfermant à l'état adulte et en bonnes conditions de vita-  
lité, par exemple dans le milieu précédent, ou en bouillon  
lactosé, et qu'on l'ensemence dans le même milieu peptoné  
et glycériné, préparé avec la même eau, mais stérilisé, à  
nouveau aéré par abandon prolongé ou agitation en flacon  
seulement obturé par du coton, la *glycéro-réaction* est géné-  
ralement *négative*, dans la phase de fermentation en milieu  
acide.

Au contraire, lorsqu'on emploie le milieu de culture gly-  
cériné simplement minéral, la *glycéro-réaction* est *positive*  
dans cette première phase, aussi bien avec le microbe con-  
sidéré à l'état sauvage qu'avec le microbe cultivé.

Il y a lieu de chercher et de donner une explication de  
cette divergence et de cette concordance, en conformité  
avec les faits expérimentalement observés.

I. -- Lorsque le ferment apporté par l'eau est ensemencé  
dans un liquide glycériné peptoné ou purement minéral, il  
passe dans un milieu plus favorable à son développement  
et sa *vie ralentie* devient *vie active*. Les transformations  
successives par déshydratation qu'il fait subir à la glycé-  
rine, telles qu'elles nous sont révélées par les réactifs chi-  
miques, apparaissent en quelque sorte comme parallèles  
aux diverses phases de son évolution. Au début de son  
développement, son activité fermentaire et par suite son  
pouvoir déshydratant sont *minima* : il engendre alors surtout  
de l'*adéhyde hydracrylique* : puis son fonctionnement vital  
et conséquemment son *activité déshydratante* croissant  
régulièrement, il complète, au cours de cette nouvelle phase  
évolutive, la soustraction d'eau en donnant naissance à



l'*aldéhyde acrylique*, dont la proportion dans le liquide, toutes conditions de vie, de composition de milieu et de température étant dans leur ensemble le plus favorables à cette formation, atteint un *maximum* révélable par le réactif *protéique acide*, et pouvant même être prévu par les seuls caractères organoleptiques.

Mais cet état de maximum ne dure pas longtemps, surtout dans le milieu peptoné, où le réactif albumineux acide accuse bientôt la disparition graduelle, devenant généralement totale, de l'acroléine. C'est qu'en effet, aux conditions précédentes de bonne nutrition, de vie particulièrement active, en succèdent d'autres de moins en moins favorables à la vitalité et par conséquent à l'activité du ferment : le milieu lui devient en quelque sorte graduellement hostile par les acides formés et vraisemblablement surtout par l'acroléine elle-même qu'il a engendrée et dont il entreprend immédiatement la destruction pour la transformer en produits moins nuisibles. En d'autres termes, la *période de formation* est suivie, dans le cas actuel où elle est réalisable, de la *période obligée de destruction* de la substance chimique paralysante qui doit posséder, vis-à-vis du microbe, le plus grand pouvoir antiseptique ou coagulant, et qui est la plus facile à transformer en raison de la plasticité de la molécule due à la fonction aldéhyde : l'*action productive* d'acroléine, d'abord prépondérante, se trouve ainsi bientôt en *équilibre* avec l'*action destructive*.

A ce sujet, il convient d'affirmer qu'il ne s'agit pas là d'une simple hypothèse ; mais que cette explication relative à la disparition constatée de l'aldéhyde acrylique résulte logiquement d'un fait révélé par l'expérience directe, laquelle montre que le bacille jouissant de la faculté de déshydrater la glycérine, est aussi capable de transformer l'acroléine d'origine *purement chimique*, directement ajoutée dans un milieu de culture favorable à son développement. Cette faculté d'un microbe de modifier à son gré en le reprenant en sous-œuvre, un composé chimique primitivement élaboré par lui, n'est d'ailleurs pas isolée dans le cadre des divers travaux accomplis par les cellules vivantes, dont l'ensemble pour chacune d'elles est toujours le résultat de l'analyse et de la synthèse. Le cas actuel est plus particulièrement intéressant, car il nous fait voir l'*antiseptique* pouvant jouer le rôle d'*aliment*.

L'action destructive exercée sur l'acroléine n'est pas seulement d'origine biologique; elle se complète aussi par voie purement chimique, en raison de l'instabilité de cet aldéhyde, surtout à l'état *naissant*, en présence de l'eau, des acides, et même des composés salins du milieu, notamment du sel ammoniacal. C'est en raison de ces deux actions destructives fondamentales, d'ordre *biologique* et *chimique*, dont la première prime la seconde, au moins quand elles agissent sur de l'acroléine à l'état *libre*, que son existence est si éphémère, surtout en milieu peptoné, dans lequel, sauf pendant un temps relativement court, où sa proportion peut atteindre un maximum qui permet de la révéler très nettement, elle ne fait en général qu'apparaître pour s'évanouir presque aussitôt. Dans le milieu minéral, où la fermentation est plus lente, en raison du développement microbien moins rapide, résultant d'une nutrition moins favorable, l'existence de cet aldéhyde est plus durable parce que la *vitesse de sa formation* l'emporte pendant plus longtemps sur la *vitesse de sa destruction*.

Dans chacun des deux milieux, lorsque la quantité des acides formés est suffisante, le microbe se trouve paralysé dans sa vitalité et conséquemment dans son *activité déshydratante* qui redevient *minima*, comme au début de la fermentation, mais pour une *cause différente* : c'est alors qu'apparaît à nouveau l'aldéhyde *hydracrylique*, substance que le ferment est impuissant à déshydrater, peut-être même à transformer d'autre façon, et la fermentation s'arrête. Elle reprend aussitôt, dès qu'on neutralise la liqueur par le carbonate de chaux : le microbe, désormais soustrait à l'action des acides, recouvre progressivement son activité déshydratante et transforme à nouveau la glycérine résiduelle en acroléine déjà révélable par le *réactif protéique acide* au bout de quelques heures.

Les phénomènes successifs de *formation* et de *destruction* observés au cours de ces deux fermentations, elles-mêmes successives, de la glycérine, en milieu acide et en milieu neutre, montrent explicitement le rôle fondamental joué par les deux aldéhydes nés de sa déshydratation, notamment l'acroléine. Ils sont d'ailleurs pleinement conformes à la logique des transformations de la matière se résolvant *graduellement* en éléments plus simples.

II. — Lorsque le ferment venant du bouillon lactosé, ou plus généralement d'un milieu convenablement nutritif, est ensemencé dans un liquide glycérimé peptoné, il apporte, avec sa vitalité parfaite, son maximum d'*activité fermentaire*, dans ce nouveau milieu très propre à l'entretien de ces qualités. Il décompose presque immédiatement la glycérine, mais sans permettre, au moins dans la plupart des cas, la révélation par les réactifs des deux composés aldéhydiques résultant de sa déshydratation : au fur et à mesure de leur formation, le *propanolal* se trouve transformé en *acroléine*, et celle-ci en ses produits de métamorphose. En d'autres termes, les *vitesse de formation* de ces deux corps intermédiaires, révélateurs de la *glycéro-réaction*, se trouvent généralement *équilibrées* par leurs *vitesse de destruction*, et l'analyse du liquide, à tout moment de la fermentation, n'en montre le plus souvent que les produits ultimes et définitifs.

Au bout de quelques jours, celle-ci s'arrête, en raison de l'influence paralysante exercée par les acides engendrés sur le bacille, dont la vitalité et par suite l'*activité fermentaire* se trouvent très notablement amoindries, et d'autant plus que le séjour dans ce milieu de souffrance se prolonge plus longtemps. Si, à ce moment, on vient à neutraliser le liquide par addition de carbonate de chaux, le microbe soustrait à l'action des acides recouvre graduellement ses qualités *vitale* et *fermentaire* : il reprend sa tâche interrompue et transforme la glycérine résiduelle ; mais, cette fois, les étapes successives de son travail, au lieu d'être très rapides, presque simultanées, ne sont que progressives et à chaque instant en rapport avec le rétablissement de ses qualités normales ; aussi, pendant un certain temps, variable, les réactifs permettent de mettre en évidence dans le liquide les deux aldéhydes de déshydratation, au moins l'un d'entre eux.

Toutes choses égales d'ailleurs, cette période de visibilité de l'acroléine est plus longue lorsqu'on a laissé plus longtemps le microbe s'affaiblir par contact avec les antiseptiques nés dans la culture ; c'est pourquoi, et cette recommandation vise spécialement le milieu peptoné, nous indiquons, dans ce qui précède, de ne commencer cette seconde phase de fermentation en liqueur neutre qu'après durée d'une semaine environ pour la première phase en liqueur acide. De même cette période s'accroît aussi, lorsqu'on

oblige le microbe à réaliser son œuvre fermentaire, en particulier cette seconde phase, à une température relativement basse, de 15° à 20°, comme celle du laboratoire. Ces conditions opératoires nous ont parfois permis de reconnaître l'acroléine pendant plus de trois semaines.

III. — Lorsque le ferment venant du bouillon lactosé ou plus généralement d'un milieu convenablement nutritif, est ensemencé dans le liquide glycériné purement minéral, il passe dans un nouveau milieu beaucoup moins favorable à son développement que celui dont il provient. Ses qualités *vitale* et *fermentaire* déclinent rapidement, tout en restant suffisantes pour accomplir la transformation de la glycérine qui s'établit lentement, progressivement, en laissant subsister dans le liquide, pendant un temps suffisant pour leur reconnaissance, les divers matériaux de la dégradation de sa molécule. Aussi est-il très facile de déceler à l'aide du réactif *protéique acide* chacun des deux aldéhydes de déshydratation, surtout l'acroléine, qui doit servir de témoignage à la *glycéro-réaction*, et dont la *vitesse de formation* l'emporte sur la *vitesse de destruction*, généralement au moins pendant quarante-huit heures, dans cette phase de fermentation en milieu acide.

Au bout de quelques jours, le microbe se trouvant paralysé par les acides engendrés, la fermentation s'arrête : elle reprend presque aussitôt après leur neutralisation par le carbonate de chaux, et le réactif albumineux acide montre à nouveau les étapes successives de la transformation de la glycérine résiduelle dans ce milieu neutre, notamment celle qui aboutit à la production de l'acroléine, dont la proportion et la persistance paraissent d'habitude encore plus accentuées que dans la phase de fermentation primitive en milieu acide, surtout si l'on a eu soin de laisser écouler un temps convenable entre le moment de l'arrêt de celle-ci et de sa reprise après neutralisation, et si la température moyenne est relativement basse, voisine de 15°. Les réactifs peuvent alors déceler l'acroléine, parfois encore un mois après cette reprise.

En résumé, dans la phase de fermentation en milieu peptoné acide, la *divergence* observée dans la qualité fermentaire du *Bacillus amaracrylus* venant directement de son habitat naturel, l'eau, ou d'une culture artificielle, tient à la



différence profonde qui existe dans l'état physiologique initial du microbe *sauvage* et du microbe *cultivé*.

Au début de la phase de fermentation en milieu neutre, et grâce à la culture préalable résultant de la période antérieure, cette différence s'est nivelée et le bacille se trouve dans des conditions de valeur *vitale* et *fermentaire* comparables dans chacune des deux expériences.

Avec le milieu glycérimé purement minéral, la *concordance* observée dans la qualité fermentaire du *Bacillus amaryllus* venant directement de l'eau ou d'une culture artificielle, tient à ce que le fossé existant entre les deux états physiologiques initiaux du microbe se trouve comblé dès la première phase de fermentation en milieu acide ; ces deux états se modifiant rapidement et en sens inverse, chacun d'eux allant en quelque sorte à la rencontre de l'autre, l'un par *croissance*, l'autre par *décroissance* de la valeur *vitale* et *fermentaire*.

Enfin, qu'il s'agisse de milieu convenablement *nutritif* ou de milieu de *disette*, à réaction *acide* ou à réaction *neutre*, le bacille jouissant de la faculté de détruire l'acroléine qu'il a formée, la *glycéro-réaction* n'est pas révélabile à tout moment de la fermentation : la période la plus favorable à sa reconnaissance étant celle où la *vitesse de formation* de l'aldéhyde acrylique l'emporte le plus sur la *vitesse de sa destruction*. Dans la phase de fermentation en milieu acide, cette période n'est pas celle qui commence avec le développement du microbe, où il engendre surtout de l'aldéhyde hydracrylique ; elle n'est pas davantage celle qui correspond au maximum de vitalité qu'il est susceptible d'acquérir dans son milieu de travail, car, à ce moment, le bacille, déjà gêné par elle, éprouve le besoin de transformer l'acroléine au fur et à mesure qu'il la produit ; cette période *opportune* correspond à une époque intermédiaire, celle de l'acheminement de l'état *vital moyen* vers l'état *vital relativement parfait*, celle où le milieu se trouve richement peuplé de bacilles en voie de développement.

C'est à ce moment de son évolution que le microbe éprouve les plus grands besoins, que sa vie anaérobie doit s'alimenter le plus au moyen de la *dislocation intérieure* de la glycérine qui est, dans le milieu minéral, le seul aliment organique pouvant lui fournir du carbone. A l'égard de son



protoplasma, la *glycérine* se comporte comme une sorte de *corps explosif*, capable de lui fournir de la chaleur en disloquant et en groupant autrement ses éléments, notamment par sa transformation en *eau* et en *acroléine*, laquelle est *exothermique*, d'après nos recherches sur la chaleur de formation de l'acroléine, reproduites au début de la quatrième partie de ce travail.

Comme à cette dégradation de la glycérine par déshydratation correspond un dégagement de chaleur relativement faible, si elle joue un rôle principal dans la dislocation, le microbe, pour suffire à son fonctionnement vital, doit transformer suivant cette voie une quantité relativement grande de cette substance, et grande aussi doit nous apparaître à ce moment la puissance de ce microbe comme ferment.

Si donc, nous attribuons à la réaction de déshydratation de la glycérine un rôle fondamental dans sa fermentation actuelle, les principes de la thermochimie sont d'accord avec ceux de la physiologie pour montrer que c'est à cette époque de la croissance du microbe, celle du plus grand besoin pour le fonctionnement vital, que doit correspondre la plus grande *activité déshydratante*. La pratique expérimentale a toujours confirmé cet aveu de la théorie : seule, elle a pu montrer la *supériorité* au cours de cette phase évolutive, de la *vitesse de formation* sur la *vitesse de destruction* de l'agent chimique révélateur de la glycéro-réaction.

Dans la phase de transformation en milieu neutre succédant à celle en milieu acide, la période propice à cette révélation commence presque aussitôt après la reprise de la fermentation. Ce milieu se trouve en effet richement peuplé en bacilles, mais dont le fonctionnement vital a plus ou moins souffert par le séjour plus ou moins prolongé au contact des acides engendrés. Soustrait à cette action paralysante, le microbe s'efforce de recouvrer progressivement sa vitalité et y arrive en reprenant activement, mais aussi graduellement, le travail de déshydratation qu'il avait dû abandonner.

---

L'eau potable glycinée peut donner la *Glycéro-réaction*.

Le *Bacillus amaracrylus* consomme l'azote nitreux.

Nous avons vu le *Bacillus amaracrylus* produire la déshydratation de la glycérine par sa culture en milieu, soit peptoné, soit moins nutritif et purement minéral, de composition précédemment donnée. Mieux encore, ce microbe peut évoluer et satisfaire à la *glycéro-réaction*, dans des milieux beaucoup moins alimentaires, en particulier ceux résultant d'une simple addition de glycérine à de l'eau ordinaire, même potable, et cela grâce à la faculté générale des êtres inférieurs de se contenter momentanément de petites quantités de substances nutritives, de l'ordre de grandeur des matières organiques et des nitrates toujours présents dans ce liquide.

Les bactéries peuvent vivre et se conserver dans l'eau parce qu'elles y trouvent toujours un peu de matière organique, et parce que, lorsqu'elles n'en trouvent plus, celles d'entre elles qui meurent servent d'aliment à celles qui subsistent. Une eau relativement riche en matières organiques, en matières minérales azotées, notamment en nitrates, peut même devenir un véritable milieu de culture pour ses bactéries. Il était presumable que l'addition pure et simple de glycérine à une telle eau, suffirait à y révéler la présence du bacille, agent de la *glycéro-réaction*.

Ayant reçu un échantillon d'eau de Montchanin pour en faire l'analyse chimique, simplement au point de vue de la potabilité, analyse dont voici les résultats comparatifs avec ceux de Dijon à la même époque :

|                                                                 | Eau<br>de Montchanin  | Eau<br>de Dijon       |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Degré hydrotimétrique total . . . . .                           | 22                    | 22                    |
| Ammoniaque et sels ammoniacaux. . .                             | Néant.                | Néant.                |
| Nitrites. . . . .                                               | Traces.               | Néant.                |
| Nitrates, en N <sup>o</sup> O <sup>3</sup> , par litre. . . . . | 10 <sup>mgr.</sup> 55 | 3 <sup>mgr.</sup> 02  |
| Chlorures, en Cl, — . . . . .                                   | 37 <sup>mgr.</sup> 85 | 3 <sup>mgr.</sup> 10  |
| Matières organiques, — . . . . .                                | 1 <sup>mgr.</sup> 125 | 0 <sup>mgr.</sup> 250 |

évaluées en oxygène emprunté au permanganate de potasse alcalin.

L'idée nous vint de tenter avec elle une culture directe en y ajoutant de la glycérine, à la dose de 5 grammes par litre, afin de savoir ce que valait, au moins pour cette eau, la présomption précédente.

Le mélange, laissé à la température du laboratoire voisine de 20°, devint en quelques jours une culture évidente : au bout de deux semaines, le bisulfite de rosaniline et le réactif *protéique acide* ajoutés, chacun à une prise d'essai du liquide, fournirent des colorations assez intenses, même verte avec ce dernier. L'acroléine fût en outre extraite par distillation et rectification, à l'état de solution diluée, et sa présence contrôlée par ses autres réactions, en particulier, par ses caractères organoleptiques très manifestes au cours de la distillation.

La même eau glycérinée, mais *stérilisée*, ensemencée avec une culture pure de *Bacillus amaracrylus* donna un résultat identique.

A la suite de cette constatation, il était intéressant de connaître les mutations éprouvées par l'azote alimentaire du milieu, au moins l'azote à formes minérales, les seules facilement reconnaissables et dosables. L'analyse fournit aussitôt les résultats suivants pour chacune des deux cultures :

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| Azote ammoniacal. . . . . | Néant. |
| — nitreux . . . . .       | Néant. |
| — nitrique. . . . .       | Néant. |

La totalité de la minime quantité d'azote minéral, nitrique et nitreux, avait donc été transformée par l'être vivant, vraisemblablement assimilée en grande partie par lui en raison de la pénurie alimentaire du milieu, peut-être aussi avec libération de traces d'azote élémentaire, cet être rentrant dans la catégorie des microbes *dénitrifiants indirects* : en tout cas, avec formation intérimaire de nitrite bien accusée, en cours de culture : quant au chlore, il avait à peine varié.

Parallèlement, la même épreuve tentée avec l'eau de Dijon, relativement pure en azote minéral comme en matière organique, et qui a servi communément à la préparation des liquides de culture de cette étude, donna un résultat négatif.

Puisque l'eau de Montchanin, de composition précédente, à teneur cependant relativement moyenne en matières organiques et même en nitrates, permet cette culture, grâce surtout au concours alimentaire de ces derniers composés azotés, que les végétaux préfèrent à l'ammoniaque,

parce qu'ils leur procurent à la fois de l'azote et de l'oxygène, il nous parut encore désirable de savoir s'il suffirait, pour obtenir le même résultat cultural et biochimique, de remonter le taux en azote nitrique de l'eau de Dijon, par addition de quelques centigrammes d'azotate de potasse par litre. L'expérience consultée répondit encore par l'affirmative, quoique avec moins d'intensité que la précédente, accusant néanmoins ainsi et à nouveau : le pouvoir alimentaire dévolu aux nitrates ; le pouvoir dénitrifiant du bacille, la culture renfermant des traces de nitrite : sa faculté déshydratante à l'égard de la glycérine, le réactif *protéique acide* révélant la présence de l'acroléine ; enfin l'exquise faculté d'assimilation des infiniment petits sachant utiliser et adapter à leurs besoins des quantités très faibles de matière nutritive.

En ce qui concerne le *Bacillus amaracrylus*, on reconnaissait déjà cette sensibilité assimilatrice au cours des épreuves culturales antérieures, en milieu peptoné ou minéral, lesquelles manifestent mieux les propriétés du microbe lorsque les liquides nutritifs ont été préparés avec de l'eau ordinaire constituant son habitat naturel et son milieu nourricier habituel, qu'avec de l'eau distillée, privée des traces de substances minérales à l'utilisation desquelles son protoplasma avait été accoutumé, et dont l'absence ne doit pouvoir être intégralement compensée par l'addition à de l'eau distillée des trois sels minéraux : sulfate d'ammoniaque, phosphate de potasse, sulfate de magnésie. En travail alimentaire, comme en travail fermentaire corrélatif du premier, la vie d'un être vivant constitue un réactif infiniment plus sensible et plus précis que nos réactifs chimiques les plus puissants : la preuve immédiate de ce fait est fournie par cette étude même, où nous voyons, dans ce qui précède comme dans ce qui suit, notre bacille utiliser jusqu'à l'ultime trace d'azote minéral que ne peuvent plus déceler les réactifs cependant ultra-sensibles des formes nitrique et surtout nitreuse de cet élément, dont les uns, comme la solution sulfurique de diphénylamine, le réactif sulfo-phénique de Grandval et Lajoux, sont communs à ces formes ; dont les autres, comme le réactif de Griess, celui de Trommsdorff à l'iodure de zinc amidonné, notamment le premier, appartiennent plus spécialement à l'acide azoteux et aux azotites.



ALIMENTATION NITREUSE. — Pour compléter ces recherches relatives à l'utilisation par notre microbe de traces d'azote minéral, nous avons tenu à nous assurer autrement, par addition directe, et parfois en l'absence de toute autre matière azotée, si les nitrites qui, d'ordinaire, sont considérés, même à doses relativement faibles, comme des substances toxiques pour les organismes inférieurs, pouvaient cependant, à dose convenable, lui servir directement de matière alimentaire azotée.

Pour résoudre ce problème, nous avons préparé d'abord quatre milieux de composition suivante :

|                         |                |                         |                |
|-------------------------|----------------|-------------------------|----------------|
| Phosphate monopo-       |                | Phosphate monopo-       |                |
| tassique . . . . .      | 0gr.75         | tassique . . . . .      | 0gr.75         |
| Sulfate de magnésie.    | 0gr.10         | Sulfate de magnésie.    | 0gr.10         |
| Nitrite de potasse...   | 0gr.1 et 0gr.2 | Nitrite d'ammoniaque    | 0gr.1 et 0gr.2 |
| Glycérine . . . . .     | 2gr.           | Glycérine . . . . .     | 2gr.           |
| Carbonate de chaux.     | 1gr.           | Carbonate de chaux.     | 1gr.           |
| Eau distillée . . . . . | Un litre.      | Eau distillée . . . . . | Un litre.      |

puis quatre autres semblables, le glucose y remplaçant la glycérine comme aliment carboné.

Ces huit milieux, stérilisés, ont étéensemencés avec une culture pure de *Bacillus amaracrylus* et placés à l'étuve à 37° : en moins de vingt-quatre heures, tous deviennent louches et sont le siège d'une culture évidente. Au bout de cinq jours, chacun des réactifs précédents de l'acide azoteux, ainsi que le réactif de Nessler, accusent la disparition totale de l'azote nitreux et ammoniacal dans les cultures à base de nitrite d'ammoniaque et de glucose : ce même délai suffit à la consommation complète de l'acide nitreux dans les cultures glucosées à base de nitrite de potasse ; enfin, les mêmes résultats sont observés au bout d'une semaine dans les cultures glycélinées.

Le problème posé est donc bien démontré : le *Bacillus amaracrylus*, alimenté dans nos milieux à base de nitrite de potasse, avec de l'acide nitreux, à l'exclusion de tout autre aliment azoté, se développe bien, en transformant la totalité de l'azote nitreux du milieu nutritif.

L'acide nitreux, terme de passage de l'assimilation des nitrates, ou produit intérimaire de fermentation de l'acide nitrique, peut être considéré comme un aliment des végétaux inférieurs, quand il leur est offert à dose convenable.



M. Mazé (1), en alimentant des plantules de maïs avec du nitrite de sodium, sans autre aliment azoté, est arrivé à la même conclusion en ce qui concerne les végétaux supérieurs.

Si nous tenons compte de l'influence paralysante exercée par les nitrites sur la végétation du *Bacillus amaracrylus*, antérieurement déterminée, les résultats précédents nous révèlent une fois de plus la double faculté *antiseptique* et *alimentaire* d'une même substance, en relation avec sa proportion et l'état de disette du milieu nutritif.

Si nous rapprochons et associons la faculté de ce microbe de créer en partie sa substance vivante aux dépens des *nitrates* naturellement contenus dans les eaux, et aussi des *nitrites*, avec sa propriété *dénitrifiante* conduisant intérieurement au stade nitreux, puis à l'azote élémentaire, nous entrevoyons le rôle qu'il doit jouer parmi le monde à l'état de mutation continue des infiniment petits peuplant le sol et l'eau, ces deux grands réservoirs de la vie microbienne, par sa contribution dans le cycle de l'évolution de l'azote dans la nature, à la *formation par dénitrification*, et à la *destruction*, soit par *réduction* plus complète, soit par *absorption*, des nitrites, dont l'*absence* ou la *présence* dans une eau n'est que la résultante d'actions biochimiques incessantes et inverses, *nitifiantes*, *dénitrifiantes* et *assimilatrices*.

Ajoutons encore que le rôle joué par les matières amidées dans la dénitrification sous l'action de ce bacille doit contribuer, pour une part, dans le bilan des pertes d'azote en agriculture, pertes qui font que le cycle d'évolution de cet élément dans la nature ne peut constituer pratiquement un cycle fermé, et sans qu'il soit nécessaire de les compenser par restitution de matières azotées.

---

(1) P. MAZÉ. — Les phénomènes de fermentation sont des actes de digestion. La dénitrification chez les végétaux supérieurs. — *Annales de l'Institut Pasteur*, t. 25, p. 369-391; 1911.

## TABLEAU COMPARATIF DE

du *Bacillus amaracrylus* d'un vin amer, du *Bacille* retiré de l'eau

CARACTÈRES COMMUNS. — Bacilles ou Coccobacilles ; anaérobies facultatifs ; ne  
avec ondes moirées : se développant en bouillon phéniqué à 1 pour 1000

| CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS           |                                         | Bacillus amaracrylus                          | Bacille de l'eau                              |
|------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>Mobilité</b> . . . . .          |                                         | Ordinairement très mobile.                    | Ordinairement très mobile.                    |
| <b>Reproduction</b> . . . . .      |                                         | Donne parfois des spores en culture ancienne. | Donne parfois des spores en culture ancienne. |
| <b>Culture</b>                     | sur pomme de terre . . . . .            | Culture très minime.                          | Culture très minime.                          |
|                                    | dans le lait . . . . .                  | Coagule rapidement.                           | Coagule rapidement.                           |
|                                    | dans le petit-lait tournesolé . . . . . | Rougit très fortement.                        | Rougit très fortement.                        |
|                                    | en milieux lactosés . . . . .           | Dégagement gazeux H et CO <sup>2</sup> .      | Dégagement gazeux H et CO <sup>2</sup> .      |
|                                    | — glucosés . . . . .                    | Dégagement gazeux H et CO <sup>2</sup> .      | Dégagement gazeux H et CO <sup>2</sup> .      |
|                                    | au rouge neutre . . . . .               | Décolore lentement, sans fluorescence nette.  | Décolore lentement, sans fluorescence nette.  |
|                                    | — lactosés, à la rosaniline . . . . .   | Donne des colonies rouges.                    | Donne des colonies rouges.                    |
| sur gélose au plomb . . . . .      |                                         | Ne noircit pas.                               | Ne noircit pas.                               |
| <b>Formation d'indol</b> . . . . . |                                         | Ne donne pas d'indol.                         | Ne donne pas d'indol.                         |
| <b>Glycéro-réaction</b> . . . . .  |                                         | Positive.                                     | Positive.                                     |
| <b>Virulence</b> . . . . .         |                                         | Non pathogène.                                | Non pathogène.                                |
| <b>A dose limite</b>               | un Eberth-sérum . . . . .               | N'agglutine pas.                              | N'agglutine pas.                              |
|                                    | un Para A-sérum . . . . .               | N'agglutine pas.                              | N'agglutine pas.                              |
|                                    | un Para B-sérum . . . . .               | N'agglutine pas.                              | N'agglutine pas.                              |

CARACTÈRES PRINCIPAUX

du *Colibacille* et des Bacilles *Typhique* et *Paratyphiques A* et *B*

prenant pas le Gram ; donnant par culture dans le bouillon un trouble uniforme à la température de 42° ; poussant bien sur la gélatine sans la liquéfier.

| Colibacille                                  | Bacille Typhique               | Bacille Paratyphique A                       | Bacille Paratyphique B                           |
|----------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Mobile, parfois immobile.                    | Ordinairement très mobile.     | Très mobile.                                 | Très mobile.                                     |
| Spores inconnues ou douteuses.               | Spores inconnues ou douteuses. | Spores inconnues.                            | Spores inconnues.                                |
| Enduit épais, jaune ou brun.                 | Culture minime.                | Culture minime.                              | Ordinairement enduit assez épais, jaune ou brun. |
| Coagule, parfois tardivement.                | Ne modifie pas le milieu.      | Ne modifie pas le milieu.                    | Ne coagule pas, éclaircit tardivement.           |
| Rougit très fortement.                       | Rougit légèrement.             | Rougit franchement.                          | Rougit très vite, puis bleuit.                   |
| Dégagement gazeux H et CO <sup>2</sup> .     | Ne donne pas de gaz.           | Ne donne pas de gaz.                         | Ne donne pas de gaz.                             |
| Dégagement gazeux H et CO <sup>2</sup> .     | Ne donne pas de gaz.           | Dégagement gazeux H et CO <sup>2</sup> .     | Dégagement gazeux H et CO <sup>2</sup> .         |
| Provoque la décoloration et la fluorescence. | Ne modifie pas.                | Provoque la décoloration et la fluorescence. | Provoque la décoloration et la fluorescence.     |
| Donne des colonies rouges.                   | Donne des colonies incolores.  | Donne des colonies incolores.                | Donne des colonies incolores.                    |
| Ne noircit pas (quelques exceptions).        | Noircit.                       | Ne noircit pas.                              | Noircit.                                         |
| Donne de l'indol.                            | Ne donne pas d'indol.          | Ne donne pas d'indol.                        | Ne donne pas d'indol.                            |
| Négative.                                    | Négative.                      | Négative.                                    | Négative.                                        |
| Pathogène.                                   | Pathogène.                     | Pathogène.                                   | Pathogène.                                       |
| N'agglutine pas.                             | Agglutine.                     | N'agglutine pas.                             | N'agglutine pas.                                 |
| N'agglutine pas.                             | N'agglutine pas.               | Agglutine.                                   | N'agglutine pas.                                 |
| N'agglutine pas.                             | N'agglutine pas.               | N'agglutine pas.                             | Agglutine. Exception : type Gärtner.             |



## QUATRIÈME PARTIE

---

### Recherches complémentaires sur la fermentation de la Glycérine par le bacille des vins amers et par le bacille des eaux.

---

Cette action particulière, commune à ces deux bactéries, primant dans leur histoire toutes les autres, il est nécessaire de poursuivre son étude et de la compléter en vue de répondre aux diverses questions qu'elle nous a suggérées et que nous avons énoncées dès le début de ce travail.

Nous diviserons ces nouvelles recherches en cinq paragraphes.

- § I. — *Signe et valeur thermochimiques de la transformation de la glycérine en acroléine.*
- § II. — *L'acroléine engendrée par cette action biochimique résulte bien de la déshydratation de la glycérine.*
- § III. — *Ce phénomène de déshydratation est-il produit par l'être vivant ou par une diastase, et cette action cellulaire ou diastasique est-elle réversible ?*
- § IV. — *La dégradation progressive de la glycérine en aldéhydes hydracrylique et acrylique constitue-t-elle une action primordiale dont dépend la genèse des autres produits de cette fermentation ?*
- § V. — *Essai d'interprétation de cette action fermentaire et comparaison avec celles antérieurement connues, s'accomplissant par déshydratation.*

Nous allons essayer de répondre à chacune de ces propositions en donnant les résultats de nos expériences complémentaires et en les associant avec les précédents.



## § I. - Signe et valeur thermochimiques de la transformation de la glycérine en acroléine.

Les bacilles que nous étudions vivent pendant la fermentation, c'est-à-dire se développent, créent de nouvelles cellules et entretiennent le fonctionnement des anciennes. Pour effectuer ce travail positif de l'édification de leurs tissus et de la synthèse de leurs principes immédiats, ils doivent trouver quelque part une source d'énergie ; or, ils n'ont pour se procurer cette énergie, ni la ressource des plantes vertes auxquelles la chlorophylle permet d'utiliser les radiations solaires, ni la puissante faculté de combustion par l'oxygène qui appartient aux animaux ; comme le principal phénomène chimique de la vie dans ces conditions est la fermentation, il faut nécessairement que la dislocation chimique des substances qu'ils transforment se produise avec dégagement de chaleur.

En ce qui concerne les fermentations actuelles de la glycérine, la formation de produits de déshydratation de cette substance, et notamment d'acroléine, paraissant être le phénomène chimique capital de ces actions biologiques, il était intéressant de connaître le signe et la valeur thermochimiques de la réaction classique fondamentale



qui traduit en substance ce phénomène.

Comme, à notre connaissance, aucun travail n'a été publié relativement à la chaleur de formation de l'acroléine, nous nous sommes décidé à faire cette détermination, malgré l'extrême désagrément que présente la manipulation d'un produit aussi irritant pour les muqueuses, et l'instabilité de cet aldéhyde due à sa très grande aptitude à se transformer par polymérisation, oxydation ou résinification.

En même temps, à titre particulier et aussi comme source de renseignements complémentaires pouvant permettre d'étendre le champ de la discussion de nos résultats, nous avons déterminé la chaleur de formation de la métacroléine, seul polymère actuellement connu de l'aldéhyde acrylique.

Chaleurs de formation de l'Acroléine et de la Métacroléine.

a) ACROLÉINE. — Pour l'obtention de l'acroléine à l'état très pur, nous avons utilisé la méthode de Senderens (1), par action d'une quantité réduite de bisulfate de potasse sur la glycérine.

Le liquide condensé dans un appareil bien refroidi par de la glace fondante a été rectifié d'abord sur de l'oxyde de plomb récemment précipité, puis redistillé sur du chlorure de calcium sec : ces deux dernières opérations ont été effectuées à l'aide d'un tube à distillation fractionnée et dans un courant de gaz carbonique sec ; le liquide recueilli dans chacune d'elles passait à la température de 52°.4, point d'ébullition de l'aldéhyde acrylique pur.

Pour la détermination de la chaleur de combustion d'un corps aussi volatil et facilement oxydable, il ne fallait pas songer à opérer sur le liquide mis à nu dans la bombe calorimétrique ou même contenu dans un petit flacon de verre à bouchon rodé à l'émeri : nous avons employé la méthode indiquée par Berthelot et Delépine (2), qui consiste à introduire le liquide dans une ampoule préalablement tarée, puis scellée à la lampe, pesée ensuite, et à faire éclater cette ampoule dans la bombe à l'aide d'une petite quantité de combustible très rigoureusement pesée et de valeur calorimétrique exactement connue.

Comme combustibles auxiliaires, nous avons utilisé le camphre et le coton-poudre ; ce dernier sous forme de mèche destinée à faire la mise de feu.

L'opération a été conduite comme pour une combustion ordinaire et effectuée dans la bombe calorimétrique de Berthelot au moyen de l'oxygène comprimé à 25 atmosphères : elle a donné lieu aux remarques suivantes :

1° La combustion est intégrale ; il ne subsiste aucun résidu de carbone sous forme de noir de fumée.

2° Pendant le temps minimum de l'opération, compris entre la mise en ampoule et la combustion, l'acroléine demeure parfaitement incolore et limpide : à la température ordinaire, cet état de conservation persiste pendant une demi-heure ; au bout de ce temps le liquide commence à louchir.

3° A la suite d'une combustion manquée, au cours de laquelle l'ampoule s'était fendue sans éclater, nous avons remarqué que le liquide était devenu très louche, alors que, toutes choses égales d'ailleurs, le contenu d'une ampoule demeurée intacte, restait parfaitement limpide : l'ampoule ainsi fêlée n'émettait aucune odeur d'acroléine. Il est vraisemblable que le louche ainsi observé provenait d'une polymérisation favorisée par la compression s'exerçant plus directement sur le liquide et par l'oxydation partielle de l'aldéhyde ainsi contenu dans un récipient non hermétiquement clos.

(1) J.-B. SENDERENS. — *Bull. Soc. Chim.*, 4<sup>e</sup> série, t. 9, p. 374 ; 1911.

(2) BERTHELOT et DELÉPINE. — *Annales de Chimie et de Physique*, 7<sup>e</sup> série, t. 21 ; 1900.







au moment de la polymérisation inévitable d'une partie de l'acroléine ainsi formée.

Elle nous fait aussi entrevoir que la formation primitive à partir de la glycérine d'un polymère, comme la métacroléine, dans un acte fermentaire, ne serait pas invraisemblable, puisque sauf dans le cas de l'aldolisation, cette formation apparaît comme productrice de chaleur. A ne considérer même que la métacroléine, la réaction



qui l'engendrerait aux dépens de l'ensemble de trois molécules de glycérine, donnerait lieu à un dégagement de chaleur notablement plus élevé que celui fourni par la production séparée des trois molécules d'acroléine entrant dans sa constitution.

## § II. — L'acroléine engendrée par cette action biochimique résulte bien de la déshydratation de la glycérine.

Dès le début de nos recherches, nous avons admis, selon toutes vraisemblances, pour la genèse par voie biologique de l'acroléine à partir de la glycérine, son mode classique de formation par voie physique ou chimique aux dépens de cette substance; au cours de leur développement, cette opinion s'est imposée à nous comme une vérité : à la fin de cette étude, il convient de réunir les faits devant la justifier.

Rappelons d'abord que, à part l'existence d'un composé aldéhydique qualifié par nous comme aldéhyde hydracrylique, nous n'avons pu trouver dans nos cultures un autre corps capable de servir d'intermédiaire entre la glycérine et l'acroléine; de plus, en y substituant à la glycérine divers produits habituels de sa fermentation, en particulier les acides butyrique, lactique et succinique, le glycérose et la dioxycétone, le glycol triméthylénique, nous n'avons pas reconnu la production de l'aldéhyde acrylique.

D'autre part, une hypothèse de la formation indirecte de cet aldéhyde aux dépens de la glycérine par l'oxydation *extérieure* d'un composé intermédiaire serait absolument incompatible avec le phénomène de la *glycéro-réaction*, laquelle fournit d'ailleurs la *preuve expérimentale de la production directe de l'acroléine par soustraction progressive*



*des éléments de deux molécules d'eau à la molécule de la glycérine.*

Chacune des fermentations successives en milieu acide et en milieu neutre, dont l'ensemble constitue les épreuves de cette réaction, s'accomplit en effet en flacon complètement rempli, bouché à l'émeri ou même *hermétiquement clos*, c'est-à-dire en l'absence d'oxygène libre. Il en est ainsi même pour la première phase fermentaire, car la faible quantité de ce gaz qui existait en dissolution au début, a été consommée par le microbe pour son développement et avant la fermentation proprement dite, laquelle crée en outre un milieu réducteur par les gaz dégagés, notamment l'hydrogène naissant. Dans la seconde phase, surtout favorable à la renaissance de l'acroléine, et comparable au point de vue de l'anaérobiose à celle qui se passe dans la bouteille de vin malade, non seulement l'oxygène fait complètement défaut dès l'origine, mais dans ce milieu essentiellement réducteur, saturé d'hydrogène et de gaz carbonique, le réactif *protéique acide* nous révèle, en quelque sorte, la *naissance* de l'acroléine *dès le début* de la reprise de la fermentation de la glycérine subsistant dans le milieu, ou *aussitôt après* l'introduction d'une nouvelle quantité de cette substance.

Ainsi donc, aucune cause d'oxydation *extérieure* ne peut accompagner la formation de l'aldéhyde acrylique au cours de la *glycéro-réaction* dans nos conditions opératoires. Comme dans la vie d'un microbe *anaérobie*, pendant cette phase de la vie anaérobie de nos bacilles agissant sur la glycérine ou sur chacune des autres substances fermentescibles, l'oxydation demeure *intérieure* et doit s'effectuer souvent au moyen de l'oxygène de l'eau, conformément à la propriété reconnue aux microbes anaérobies de pouvoir décomposer ce corps, et ainsi que nous avons été conduit à l'admettre nous-même pour l'explication de certains des résultats de nos fermentations.

La déshydratation bactérienne de la glycérine envisagée par nous correspond à la combustion de la moitié de l'hydrogène de sa molécule; et il s'agit ici, non pas d'une combustion *intérieure* surérogatoire nécessitant le concours de l'oxygène d'une autre molécule particulièrement stable, comme celle de l'eau, mais d'une combustion *intérieure* propre, c'est-à-dire qu'elle se fait aux dépens de l'oxygène même de la substance. En d'autres termes, ce phénomène

serait pour nos bacilles et à l'égard de l'hydrogène de la glycérine, analogue à la combustion *interne* par la levure d'une partie du carbone du sucre dans le phénomène de la fermentation alcoolique.

En examinant les faits suivants établis par nos expériences et nos résultats de fermentation : genèse rapide, initiale, de l'acroléine ; production intérimaire d'un aldéhyde possédant les caractères de l'aldéhyde hydracrylique, premier terme de déshydratation de la glycérine ; milieu privé d'oxygène et même réducteur ; exothermicité des réactions de transformation de la glycérine en acroléine et de polymérisation de cet aldéhyde ; faculté de combustion *interne* dévolue à nos microbes dans leur travail fermentaire en vie anaérobie, nous les considérons comme *suffisants* par leur entière concordance, sans être même tous *nécessaires*, pour admettre que, soit dans le processus naturel de la maladie de l'amertume des vins, soit dans l'épreuve artificielle de la glycéro-réaction, *l'acroléine naît directement de la glycérine par le mécanisme de la déshydratation progressive de cette substance.*

Habitué que nous sommes à voir les ferments travailler dans le même sens que nos sources d'énergie du laboratoire, nous devons trouver encore un argument favorable à ce mécanisme fermentaire dans cette loi de similitude. Bien plus, si nous comparons avec raison les ferments à des catalyseurs, et si nous envisageons les résultats des expériences de la déshydratation catalytique de la glycérine par l'alumine ou son sulfate, mentionnées dans notre introduction, nous pouvons reconnaître une ressemblance encore plus étroite entre ces deux formes, biologique et chimique, du même phénomène.

REMARQUE. — Poursuivons l'intéressante comparaison que nous venons d'indiquer entre ces soustractions par actions biochimiques, d'eau à la molécule de la glycérine dans sa transformation en acroléine par nos bacilles, d'anhydride carbonique à la molécule d'un sucre dans sa transformation en alcool par la levure.

Le dégagement de chaleur qui résulte de cette combustion *intérieure* de la moitié de l'hydrogène de la glycérine est pour nos bacilles, quoique à un degré beaucoup moindre, ce qu'est à la levure le dégagement de chaleur produit par

la combustion *intérieure* du tiers du carbone du sucre. Comme celui de la levure, le protoplasma des microbes que nous étudions est organisé à la fois pour vivre au contact de l'air et pour produire en vie *anaérobie* cette dislocation intérieure de la glycérine et en bénéficier. Quel que soit le rôle, principal ou secondaire, de la formation de l'acroléine, le léger dégagement de chaleur produit dans cette *déshydratation par combustion interne* figure au nombre des sources de la vie cellulaire. Dans ce phénomène, comme dans celui de la fermentation alcoolique, nous retrouvons à la suite de Pasteur et d'après Duclaux, trois notions qui se commandent.

« Toute vie *anaérobie* s'alimente au moyen de la dislocation intérieure d'une matière organique qui est un aliment pour le microbe qui l'utilise et se comporte en présence de son protoplasma comme une sorte de corps explosif, capable de fournir de la chaleur en se disloquant et en groupant autrement ses éléments. Ce corps explosif au contact d'un protoplasma, peut très bien ne pas l'être ou l'être autrement au regard d'un autre.

« Moins il donne de chaleur en se disloquant, plus, d'une manière générale, le microbe qui l'utilise devra en détruire pour suffire à son fonctionnement vital, et plus la puissance de ce microbe comme ferment nous apparaîtra grande. »

Ces conceptions, et notamment la dernière, jointes aux faits que nous avons reconnus, surtout à la constatation de la formation et de la destruction continues de l'acroléine au cours de la fermentation, nous autorisent à considérer ce phénomène de déshydratation de la glycérine comme fondamental dans le mécanisme des transformations que nos bacilles font subir à cette substance, dont il semble être en quelque sorte la clef d'ouverture.

### § III. — Ce phénomène de déshydratation est-il produit par l'être vivant ou par une diastase, et cette action cellulaire ou diastasique est-elle réversible ?

Tout d'abord, et à première vue, il peut paraître convenable d'écarter l'hypothèse d'une déshydratation par réversibilité d'une action hydratante qui construirait de la glycérine par fixation d'eau sur l'acroléine ; car, en raison de l'instabilité de cette dernière substance, il ne peut se pro-

duire un état d'équilibre dans le système chimique des trois constituants, *glycérine, eau, acroléine*, pas plus que dans le système intermédiaire, *propanolal, eau, acroléine*. Or, cet état d'équilibre est d'ordinaire inséparable de l'action réversible : on l'observe aussi bien dans un phénomène physico-chimique, comme la dissociation du carbonate de chaux, ou purement chimique, comme l'éthérification, que dans un phénomène biochimique tel que la production des bioses synthétiques rappelée dans notre introduction.

Cependant, dans ces phénomènes, il convient de considérer un tel équilibre simplement comme une conséquence de l'action réversible qu'il sert à reconnaître. Sa production dans un système en évolution, à masse totale invariable, c'est-à-dire dont les constituants demeurent inaltérés dans les conditions de l'expérience, coïncide avec l'arrêt de la transformation dans un sens ou dans l'autre : l'observation de cet *état limite*, qui correspond en quelque sorte à la phase critique du phénomène, est un signe de la réversibilité.

Mais, de même qu'il y a des réactions limitées qui ne sont pas réversibles et qui sont seulement des réactions d'équilibre, comme la dissociation de l'acide iodhydrique ou la décomposition des solutions de chlorure d'or par la lumière, l'absence d'un tel état d'équilibre n'implique pas forcément celle de la propriété inverse. En particulier, l'ensemble chimique, *propanolal, eau, acroléine*, ne peut constituer un système en équilibre ; cependant, le propanolal se prépare par hydratation de l'acroléine sous l'action de la chaleur, et le même agent produit la réaction inverse de déshydratation du propanolal en régénérant l'acroléine.

Si, de même, l'ensemble chimique, *glycérine, eau, acroléine*, ne peut réaliser sous aucune proportion des constituants un système en équilibre, il ne saurait en résulter pour un agent fermentaire capable de déshydrater la glycérine, l'impossibilité d'exercer une action hydratante à l'égard de l'acroléine. Un tel agent, possédant cette propriété inverse, mis en rapport avec la glycérine, sera susceptible de la transformer complètement par suite de l'instabilité de l'acroléine ; cependant, nous pourrions facilement constater la production de cet aldéhyde, à la fois par ses caractères organoleptiques, ses réactions colorées, et même, comme nous l'avons fait dans l'étude actuelle, à l'aide de son oxy-



dation suivie de la reconnaissance de l'acide acrylique sous forme de son sel d'argent. Inversement, l'acroléine, mise en présence de ce même agent, pourra subir aussi une transformation complète, mais l'étude de ce second phénomène sera beaucoup moins facile que celle du premier : d'abord, en raison de la puissance antiseptique de l'aldéhyde acrylique imposant l'obligation de maintenir la richesse acroléinique du milieu au-dessous de la quantité maxima compatible avec l'activité de l'agent fermentaire, et de transformations chimiques ou biochimiques diverses, en particulier son altération par l'eau, d'où résultera pour la glycérine pouvant exister à un moment donné dans le mélange une valeur toujours minime ; ensuite, parce que la glycérine ne possède pas de réactions aussi sensibles que l'acroléine, et que, pour la caractériser, il faut au préalable l'extraire, et même la transformer chimiquement, opérations qui ne se font pas sans des pertes pouvant atteindre l'ordre de grandeur de la quantité de substance que l'on recherche.

En résumé, dans un système chimique en évolution, à masse invariable, l'état d'équilibre est nécessaire, s'il n'est pas toujours suffisant, à la production du phénomène réversible et sert à le caractériser. Si la masse devient variable, par suite de la disparition graduelle de l'un des constituants du système, cette phase limite faisant défaut ne peut plus servir de critérium à la propriété inverse inhérente à tel ou tel agent, physique, chimique ou biologique, qui, de ce fait, et en l'absence de moyens suffisamment sensibles, peut rester dissimulée.

Ajoutons encore que, d'après le résultat de nos recherches thermochimiques exposées dans un paragraphe précédent, la réaction de déshydratation de la glycérine n'est pas trop exothermique pour qu'elle ne puisse pas avoir son action inverse. Car, en vertu des lois de la thermochimie, on conçoit, *a priori*, que seules doivent être réversibles les actions fermentaires qui s'accompagnent d'un dégagement de chaleur faible ou nul.

Aussi, et malgré l'impossibilité d'opérer avec une solution d'acroléine suffisamment concentrée, comme il convient dans l'étude d'une action réversible, nous avons cru néanmoins utile, en raison de l'importance pour la chimie physiologique d'un tel mode de synthèses organiques, de



procéder à la recherche de ce pouvoir inverse au cours des essais relatifs à l'étude de l'action directe de nos bacilles sur l'acroléine, effectués en ajoutant chaque jour une petite quantité de cet aldéhyde, purifié avec soin de toute trace de glycérine, au milieu minéral de Laurent peptoné renfermé dans des flacons de un litre, pleins et bouchés, maintenus à 30°, et contenant en pleine évolution le bacille des vins amers ou le bacille des eaux, tous deux ayant été prélevés dans des cultures dont ils venaient de transformer la glycérine en acroléine, et se trouvant par conséquent bien acclimatés. Parallèlement à ces essais de fermentation et pour leur servir de témoin, nous avons ajouté des doses quotidiennes identiques d'acroléine à un égal volume du même milieu de culture stérile.

En suivant à l'aide du réactif *protéique acide* les variations de l'acroléine dans chaque liquide, nous avons reconnu que l'aldéhyde se transforme progressivement, mais beaucoup plus lentement dans le milieu stérile que dans les milieux cultivés. Au bout de deux mois, et après addition totale dans chaque flacon de cinq grammes d'acroléine, les liquides de culture sont très nettement colorés en jaune, vraisemblablement par suite d'une résinification, et ne contiennent que des traces d'aldéhyde alors que le liquide témoin en renferme encore une quantité très notable et est à peine coloré. Cette simple expérience par comparaison met bien en évidence l'influence favorable exercée par une action physiologique sur la transformation progressive de l'aldéhyde acrylique, influence que nous avons déjà plusieurs fois reconnue au cours de cette étude.

Dans le but de savoir si la glycérine figure parmi les produits de métamorphose de l'acroléine, nous avons traité chacun des liquides de culture comme s'il se fût agi d'en extraire et d'y doser cette substance, en utilisant les méthodes classiques déjà rappelées dans ce qui précède. Dans aucun des extraits obtenus avec ces deux liquides, nous n'avons pu constater la présence de la glycérine, malgré l'utilisation des moyens d'investigation les plus sensibles pour ce corps, notamment par production d'acroléine sous l'action du bisulfate de potasse et reconnaissance de cet aldéhyde à l'aide de notre réactif, ou par transformation en dioxyacétone au moyen de l'eau de brome et en

utilisant les réactions colorées de ce dernier corps ou de son dérivé d'anhydrisation, le méthylglyoxal, décrites par Denigès (1).

Ces expériences auraient été grandement facilitées, si, comme dans les cas analogues, nous avions pu mettre directement une diastase en réaction ; les ferments solubles étant moins sensibles à l'influence des toxiques que les ferments figurés ; nous aurions pu ainsi maintenir le titre du mélange en acroléine, et par suite en glycérimé, dans le cas de réversibilité, à un taux plus élevé : de plus, la moindre complexité du milieu aurait encore favorisé l'extraction de cette dernière substance. Pour ces raisons, l'essai eut été plus sensible, mais nous ne pouvions le tenter suivant ce mode, qu'après avoir déjà réellement constaté la production d'une diastase capable de déshydrater la glycérine.

#### Recherche d'une diastase de déshydratation.

En étudiant à ce point de vue les liquides de culture glycérimés de chacun des bacilles, et en cherchant à en isoler un ferment soluble par précipitation : soit par l'alcool ; soit par le sulfate d'ammoniaque à saturation, avec dialyse consécutive du précipité ; ou par entraînement à l'aide d'un corps capable de précipiter les solutions colloïdales des diastases par neutralisation de la charge électrique du colloïde, comme le phosphate de chaux naissant dans la liqueur, nous n'avons pas reconnu dans les précipités obtenus, la présence d'un tel principe capable de faire naître de l'acroléine, décelable par notre réactif, dans des solutions aqueuses de glycérine faibles ou moyennement concentrées. Ces solutions avaient été additionnées d'antiseptiques divers, tels que chloroforme, thymol, toluène, fluorure de sodium, employés en quantité juste suffisante pour inhiber l'action vitale sans empêcher l'action diastasique, et aux doses respectives suivantes : chloroforme, une goutte ; thymol, 0 gr. 1 ; toluène, 1<sup>cc</sup> ; fluorure de sodium, 1 gr. ; pour 100 centimètres cubes de liqueur.

Le résultat a été le même en employant comme source diastasique un liquide de culture minérale glycérimée, neutre,

(1) G. DENIGÈS. — *Comptes rendus, Académie des Sciences*, t. 148, pp. 172, 282, 422 ; 1909. *Précis de Chimie analytique*, 4<sup>e</sup> éd., pp. 195, 199 ; 1913.

complètement fermenté, ne donnant plus la réaction de l'acroléine, et en utilisant pour la séparation du microbe et de la diastase recherchée, la méthode par filtration à la bougie de porcelaine.

Nous n'avons pu davantage mettre en évidence l'existence d'une *endodias*tase n'émigrant pas en dehors de la cellule, accomplissant son travail sur place, analogue en un mot à la zymase alcoolique, qui, dans la levure vivante, reste intimement unie au protoplasma et n'arrive pas, comme l'invertine, à se diffuser au dehors.

En résumé, nous n'avons pas constaté chez l'un ou l'autre de nos bacilles, la propriété de sécréter une diastase spéciale, séparable par les moyens classiques usuels, sinon réellement visible, au moins reconnaissable aux produits de son action, c'est-à-dire capable de déshydrater la glycérine, ni le pouvoir réversible hydratant à l'égard de l'acroléine : mais il s'agit là de problèmes toujours délicats à résoudre, peut-être même, en l'espèce, inaccessibles à l'expérience.

#### § IV. — La dégradation progressive de la glycérine en aldéhydes *hydracrylique* et *acrylique* constitue-t-elle une action primordiale dont dépend la genèse des autres produits de cette fermentation ?

De tous les produits analytiquement reconnus au cours de cette transformation, ces deux aldéhydes sont les dérivés les moins simplifiés de la glycérine : dans leur structure se retrouve en effet le noyau fondamental de cet alcool triatomique dont ils proviennent en outre par une simple opération de déshydratation.

Cette simplification moléculaire par perte d'eau de constitution est assez fréquente dans les réactions de la chimie pure, aussi bien organique que minérale, et marque souvent la première phase de l'action exercée sur un corps à l'aide de la chaleur, seule, ou associée avec un réactif déshydratant : l'action continuant, le composé qui en résulte peut être, à son tour, l'origine de transformations nouvelles aboutissant par la formation de termes encore plus simples, à la dégradation aussi complète que possible de la molécule primitivement mise en expérience. Qu'il nous suffise, en particulier, de citer : d'abord, la décomposition par la chaleur, de l'acide sulfurique, en eau et anhydride sulfurique, puis en oxygène, eau et gaz sulfureux ; ensuite, les transformations qui relient les nitriles aux sels ammoniacaux par l'intermédiaire des amides, notamment les déshydratations successives

opérées à partir du formiate d'ammoniaque, aboutissant d'abord à la formamide, puis au formonitrile ou acide cyanhydrique ; ce dernier pouvant ensuite être décomposé par l'étincelle électrique en ses constituants, azote, acétylène, et celui-ci, en carbone et hydrogène ; ensemble de réactions amenant une rupture complète de la molécule initiale ; enfin, la dégradation par l'action des forces physico-chimiques de la glycérine elle-même.

Parfois aussi, le composé provenant de la première phase de la transformation peut s'unir, soit avec lui-même, soit avec une partie de la substance non décomposée, soit avec une autre produite en même temps que lui ou en dérivant par analyse, pour donner naissance à un corps plus complexe que la molécule primitive. De telles formations synthétiques s'observent en particulier lorsque le composé intermédiaire possède, comme dans le cas actuel, la fonction aldéhyde, en raison de l'aptitude réactionnelle de cette fonction manifestée par les phénomènes de polymérisation, d'acétalisation ou d'aldolisation.

Comme la formation des aldéhydes hydracrylique et acrylique a lieu dès le début de chacune de nos fermentations de la glycérine, il était intéressant de se demander et de rechercher si ce processus initial de déshydratation, grâce à la reprise de ces aldéhydes en sous-œuvre par le bacille, ou du fait d'actions chimiques secondaires, pouvant encore fournir des composés susceptibles d'une modification bactérienne, n'était pas l'origine d'au moins quelques-uns des produits analytiques ou synthétiques engendrés au cours de l'action fermentaire.

Cette recherche, nous avons déjà eu l'occasion de l'examiner en partie dans l'étude de l'action *directe* de nos bacilles sur l'aldéhyde hydracrylique et l'acroléine, et de faire connaître nos observations sur leur transformation plus ou moins facile, du fait de cette action.

A partir de l'aldéhyde hydracrylique, nous n'avons pu constater ainsi l'existence de tels liens de dérivation, sauf pour le glycol triméthylénique : mais nos résultats positifs antérieurs obtenus par voie *indirecte*, à partir de la glycérine, ont seuls une signification ; et nous devons considérer cet aldéhyde comme l'intermédiaire nécessaire entre la substance mère et le produit secondaire de déshydratation, qu'il intervienne, soit à l'état naissant, soit sous forme de combinaison particulière avec la glycérine ou avec un composant, même minéral, du milieu de culture. L'étude nouvelle de problèmes aussi complexes, nous apporte chaque jour de nouveaux faits propres à nous faire pénétrer mieux l'intimité des phénomènes biochimiques ; les récentes décou-



vertes dans le domaine de la fermentation alcoolique, et en particulier le rôle accélérateur des phosphates dans la transformation du sucre par le suc de levure, la formation préalable d'un hexosephosphate, suivant les travaux de plusieurs auteurs, notamment Lebedew (1), en sont un remarquable exemple.

En ce qui concerne l'acroléine, lorsqu'on soumet à l'analyse les liquides de culture par action fermentaire directe, on y reconnaît la présence de petites quantités des acides formique et surtout acétique; mais nous savons que la métamorphose aqueuse de cet aldéhyde donne naissance à ces composés en même temps qu'à de l'acide acrylique. Bien qu'il s'agisse là d'une action secondaire pouvant être exclusivement chimique et distincte de l'action biologique que nous envisageons surtout actuellement, nous devons cependant considérer la production des acides formique et acétique comme dépendante, au moins en partie, de celle de l'acroléine; la formation de l'acide acrylique devant s'y rattacher en totalité. Ces deux influences, biologique et chimique, doivent même intervenir simultanément, et la métamorphose aqueuse de l'acroléine par action biochimique, *au moment de sa naissance*, doit constituer une phase importante dans cette fermentation de la glycérine.

Nous devons maintenant enregistrer un nouveau résultat expérimental permettant d'expliquer la production, au moins partielle, des gaz hydrogène et anhydride carbonique, par décomposition élémentaire de l'acide formique. En renversant sur le mercure un tube plein de bouillon de viande peptoné contenant en dissolution 1 pour 100 de formiate de chaux,ensemencé avec l'un de nos bacilles et placé à l'étuve à 37°, on observe bientôt un dégagement constitué par les deux gaz de nos fermentations.

Récapitulons les faits suivants : *d'une part*, les formations préalables et continues des aldéhydes hydracrylique et acrylique, le second dérivant facilement du premier, au moins par action physique ou chimique; leur transformation relativement assez rapide, en tout cas beaucoup moins lente qu'en milieu stérile; la réapparition immédiate de l'acroléine dès qu'on remet en activité par addition de carbonate de

(1) A. LEBEDEW. — Sur le mécanisme de la fermentation alcoolique. — *Annales de l'Institut Pasteur*, t. 25, p. 816; 1911.



chaux une fermentation arrêtée par la trop grande acidité du milieu ; sa métamorphose aqueuse avec production des acides formique, acétique et acrylique ; sa puissance antiseptique ; la décomposition bactérienne de l'acide formique en ses constituants gazeux, hydrogène et anhydride carbonique ; la relation d'alcool à aldéhyde existant entre le glycol triméthylénique et l'aldéhyde hydracrylique ; et encore, la grandeur de la différence évaluée entre la quantité de glycérine transformée et celle des éléments dosés, différence qui doit être représentée surtout par l'eau de la déshydratation ; *d'autre part*, la remarquable aptitude réactionnelle des aldéhydes que l'on retrouve dans leurs procès de fermentation et qui, à ce point de vue, permet même de les ranger en première ligne dans la classe des corps capables de subir cette transformation biologique ; enfin, la faible exothermicité de la réaction de déshydratation de la glycérine.

En rapprochant et en coordonnant ces faits, nous nous croyons autorisé à considérer ces aldéhydes, libres ou combinés, comme les intermédiaires indispensables à la formation d'au moins certains des produits ultimes et définitifs dans cette fermentation de la glycérine.

En particulier, la puissance toxique de l'acroléine vient en opposition avec l'idée de l'envisager comme un corps accessoire de fermentation, comme un produit de fantaisie élaboré par le microbe, dont il ne tirerait qu'un profit médiocre ou nul, en compensation de l'action nuisible exercée sur ses fonctions vitales. Cet aldéhyde est un antiseptique très actif, raison pour laquelle il n'existe jamais qu'en petite quantité dans le milieu de culture. Nos recherches nous ont montré que sa production et sa consommation par le microbe lui-même, indépendamment de sa destruction par voie chimique, sont incessantes dans le cours de la fermentation : de plus, lorsque celle-ci languit ou s'arrête par suite de l'excès d'acidité du milieu, et bien qu'il reste encore de la glycérine à transformer, il suffit de saturer le liquide par du carbonate de chaux pour voir réapparaître l'acroléine avec la reprise de la fermentation elle-même.

Ce dernier fait est capital : considéré même isolément, il permet d'entrevoir que l'aldéhyde acrylique ne joue pas seulement vis-à-vis de nos microbes le rôle d'une matière à la fois *antiseptique* et *alimentaire*, suivant sa proportion et

leur degré d'acclimatation, mais encore qu'il préside en quelque sorte aux destinées de la fermentation qu'ils font subir à la glycérine.

Ensuite, la transformation de la glycérine en acroléine s'accompagne d'un dégagement de chaleur si peu notable qu'on ne peut guère la considérer comme une réaction parasite surajoutée, intervenant simplement pour relever par son appoint le signe thermochimique exothermique de l'action totale, en servant ainsi d'adjuvant à d'autres actions fermentaires. Les notions exposées à la suite de notre comparaison entre les phénomènes de combustion *intérieure* conduisant à cette soustraction d'eau à la molécule de la glycérine par nos bacilles, et à la soustraction d'anhydride carbonique à la molécule d'un sucre par la levure, nous font entrevoir, au contraire et en outre, le rôle fondamental de cette réaction dans le mécanisme de nos transformations microbiennes de la glycérine.

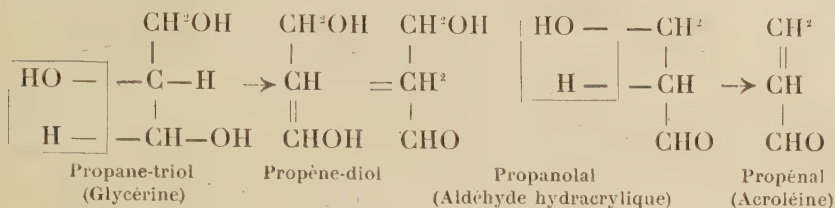
Enfin, l'aldéhyde hydracrylique lui-même, paraît n'être dans ces fermentations qu'un corps intérimaire contribuant pour une part à la formation de l'acroléine par soustraction d'eau plus complète, et pour une autre part à celle du glycol triméthylénique par fixation d'hydrogène.

#### § V. — Essai d'interprétation de cette action fermentaire et Comparaison avec celles antérieurement connues s'accomplissant par déshydratation.

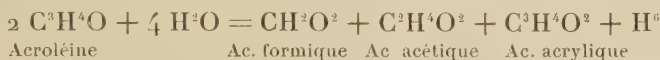
L'ensemble des faits biochimiques observés au cours de notre étude, joints à d'autres purement chimiques, antérieurement acquis, permettent de concevoir la production des phénomènes directeurs de cette fermentation, à l'aide de réactions successives de *soustraction* et de *fixation des éléments de l'eau*.

1<sup>o</sup> Les formations initiales des aldéhydes *hydracrylique* et *acrylique*, établissent nettement et à l'origine de la transformation, l'action *déshydratante analytique*. En conformité avec ce que nous savons sur les processus de déshydratation par voie purement chimique : des glycols  $\alpha$  (position 1, 2), se transformant en aldéhyde ou en cétone suivant qu'ils renferment une fonction alcool primaire ou non ; de la glycérine, conduisant à l'acroléine par l'intermédiaire du propanolal ; le schéma suivant déjà expliqué dans ce qui précède, représenterait

les diverses étapes de la transformation de la glycérine dans cette première phase fermentaire :



2° L'acroléine est particulièrement sensible à l'action de l'eau qui la décompose avec production des acides formique, acétique et acrylique, indépendamment d'autres dérivés par polymérisation ou résinification. Chacune de ces trois molécules acides étant plus riche en oxygène que celle de l'aldéhyde acrylique, cette décomposition ne peut résulter que d'une *combustion intérieure* au moyen de l'oxygène de l'eau, avec mise en liberté d'hydrogène. Elle peut être représentée, au moins qualitativement, par l'équation suivante :



Il est vraisemblable que si cette oxydation intérieure peut avoir lieu par simple contact et à la température ordinaire, elle se trouvera grandement facilitée par la présence d'un microbe anaérobie jouissant de la propriété de prendre aux composés oxygénés du milieu où il vit, l'eau en particulier, l'oxygène nécessaire à l'entretien de sa vie protoplasmique, c'est-à-dire aux travaux d'oxydation et d'élimination portant sur l'aliment et sur les éléments usés de la cellule vivante.

Ces deux phases successives, avec soustraction entière des éléments de l'eau dans la première ; avec addition des mêmes éléments dans la seconde, totale pour l'oxygène, partielle pour l'hydrogène, sont entièrement conformes aux faits chimiques classiques s'y rapportant, et aux faits biochimiques présentement reconnus. Ajoutons que l'acide acrylique peut en outre résulter isolément d'une oxydation simple de l'acroléine par le même moyen de l'oxygène de l'eau, avec libération d'hydrogène.

Examinons chacun des acides formés dans cette seconde phase et voyons quel peut être son sort dans la suite de la fermentation. L'acide acétique, considéré comme produit de la vie microbienne, constitue un terme généralement stable. Il n'en est pas de même de l'acide formique dont la molécule chimique diffère complètement par son instabilité d'où dépend son caractère réducteur, et même par son pouvoir antiseptique supérieur, de celle des autres acides de la même série dont il est le chef de file. Aussi, cet acide constitue généralement un terme de passage dans les fermentations, et les bactéries le décomposent plus ou moins facilement, ainsi que les formiates, en libérant de l'hydrogène et de l'anhydride carbonique.

Dans les résultats numériques de nos fermentations de la glycérine par nos bacilles, surtout celui de l'eau, cet acide figure en quantité bien inférieure à celle de l'acide acétique. Est-ce parce qu'il est produit en proportion relativement faible, ou bien parce que sa formation est suivie de sa décomposition partielle ? Cette dernière hypothèse est la plus vraisemblable, et la simple expérience relatée dans le paragraphe précédent vient la confirmer par le dégagement d'hydrogène et d'anhydride carbonique qu'elle fournit. Cette confirmation d'une opinion plusieurs fois émise au cours de ce travail explique l'infériorité relative des rendements de nos fermentations en acide formique dont la décomposition partielle contribue à leur dégagement gazeux.

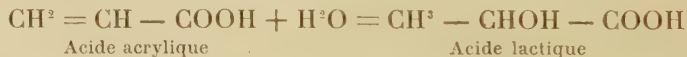
L'acide acrylique également, ne doit pas représenter un terme stable en raison de la non-saturation de sa molécule et de sa facilité d'hydratation. Sa proportion est très inférieure à celle de l'acide acétique, plus encore que celle de l'acide formique, et il paraît constituer, lui aussi, un produit intérimaire dans cette fermentation de la glycérine.

Si nous connaissions quantitativement le phénomène de la décomposition aqueuse de l'acroléine, la comparaison des proportions relatives des trois acides qu'elle engendre, avec celles des mêmes représentants trouvées dans nos fermentations, pourrait servir d'indication sur l'importance des transformations que nous venons d'envisager pour les acides formique et acrylique.

Voyons maintenant si nous pouvons, à partir de l'un ou de plusieurs des composés précédents, établir les formations des autres produits de la fermentation.

3° *L'acide lactique peut-il reconnaître comme origine l'hydratation de l'acide acrylique ?*

L'acide acrylique, chauffé à la température de 100°, même en liqueur diluée, est transformé par une dissolution de soude en excès en donnant de l'acide hydracrylique, par une réaction d'hydratation qui fournit en même temps de l'acide lactique ordinaire.



Cette transformation, en admettant que notre microbe soit capable de l'opérer, expliquerait le résultat quantitatif très faible en acide acrylique, trouvé à l'analyse. En raison de la production continue de l'acroléine dans le vase à fermentation, de son oxydation par voie chimique et biochimique au moyen de l'oxygène de l'eau avec formation constante d'acide acrylique, la faible quantité de cet acide existant parmi les produits d'une fermentation terminée, conduit à le considérer, lui aussi, et de même que l'acroléine dont il dérive, comme un terme de passage, composé intérimaire capable d'être à son tour transformé en un corps plus stable, comme l'est habituellement l'acide lactique. Ces considérations jointes à la réaction d'hydratation précédente, apportent un sérieux appui à l'hypothèse énoncée, relative à l'origine de l'acide lactique.



Cette présomption s'accroît encore par ce fait que, d'après Moldenhauer (1), l'acide hydraacrylique lui-même est transformable en acide lactique par une ébullition prolongée avec un excès de soude, et qu'il doit être considéré comme un acide polylactique analogue aux alcools polyéthyléniques ; il serait formé par la condensation de quatre molécules d'acide lactique, avec élimination d'une molécule d'eau.

4° *Le glycol propylénique doit dériver de son aldéhyde, le propional, par hydrogénation, suivant la formule classique, et en raison de faits expérimentaux déjà mentionnés.*

5° *L'alcool éthylique et une partie de l'acide carbonique peuvent-ils être envisagés comme résultant du dédoublement de l'acide lactique?*

La possibilité de ce dédoublement serait en accord avec l'opinion primitive de plusieurs auteurs, sur le rôle prépondérant de cet acide dans le phénomène de la transformation du sucre par la levure ; mais, d'une part, ce rôle d'intermédiaire ne paraît pas avoir été jusqu'à présent définitivement établi ; d'autre part, nos essais de culture du bacille de l'eau en présence de lactate d'ammoniaque ou de lactate de chaux, ne nous ont pas montré ce dédoublement. En un mot, ces résultats, antérieurs ou actuels, ne nous fournissent aucune base solide à l'appui de la genèse par notre microbe, de l'alcool et de l'acide carbonique aux dépens de la molécule lactique.

Quant aux origines de l'acide succinique et de l'acide caprylique, elles paraissent plus incertaines encore que celle de l'alcool éthylique : nous devons cependant rappeler que Béchamp (2) a reconnu la présence de l'acide caprylique dans les produits de la fermentation butyrique du lactate de chaux.

En résumé, cet essai d'interprétation fermentaire nous montre diverses phases faisant dériver les produits de la transformation de la glycérine les uns des autres, par le mécanisme principal de réactions successives de *soustraction* et de *fixation* des éléments de l'eau : phases, dont les unes, 1, 2, 4, sont démontrées et classiques ; la réalisation de la première étant subordonnée à la présence de l'être vivant, celle de chacune des deux autres pouvant être purement chimique ou dépendante aussi de l'activité protoplasmique.

Quant aux phases 3, 5, et malgré la réaction chimique également classique qui vient à l'appui de la réalisation de la première par voie bactériologique, son accomplissement suivant le processus que nous indiquons demeure hypothétique, et la genèse des corps envisagés demande l'acquisition de faits nouveaux à l'expérience.

(1) MOLDENHAUER. — Umwandlung der Hydraacrylsäure in Milchsäure. *Annalen der Chemie und Pharmacie*, t. 131, p. 330 ; 1864.

(2) BÉCHAMP. — *Bull. Soc. Chim.*, 3<sup>e</sup> série, t. 11, p. 531 ; 1894.



Néanmoins, il convient de reconnaître que cet essai d'explication de ce phénomène fermentaire de la glycérine est en accord sur plusieurs points fondamentaux avec des faits antérieurement acquis et avec ceux observés dans son étude. Il satisfait pleinement à notre idée de considérer dans ce phénomène la déshydratation de la glycérine comme un acte primordial dont doit dépendre la formation d'autres substances résultant de cette fermentation.

\*  
\* \* \*

De l'ensemble des faits et déductions qui précèdent, ce phénomène nous apparaît comme distinct de ceux antérieurement connus, mentionnés dans les généralités servant d'introduction à notre étude, et s'accomplissant par *soustraction d'eau* à un ensemble moléculaire plus ou moins complexe.

*Ces derniers sont dus, soit à des ferments figurés, soit à des ferments solubles, et conduisent par cette voie de déshydratation à la formation de produits synthétiques ; tandis que la production de l'acroléine à partir de la glycérine nous apparaît comme un travail de pure analyse.*

Dans aucune de nos nombreuses expériences, nous n'avons pu reconnaître la formation *initiale* d'un polymère, comme la métacroléine. Le dépôt des cultures contient bien une petite quantité d'un corps blanc, insoluble, capable de régénérer de l'acroléine, mais il y a lieu de le considérer comme un produit *secondaire* de polymérisation ou de résinification de l'aldéhyde acrylique au sein de l'eau, analogue au disacryle ou à la résine d'acroléine, et non comme un produit de préformation. Quant au liquide de culture, il suffit de le distiller ou même de l'évaporer dans le vide pour en dégager l'aldéhyde acrylique et percevoir son odeur caractéristique. A moins donc d'admettre la production d'un polymère très instable et de plus soluble dans l'eau, qualités que ne possède pas la métacroléine, l'aldéhyde acrylique révélé par le réactif *protéique acide* apparaît comme un produit direct d'analyse et non comme résultant de la dissociation secondaire d'un produit de synthèse qui en serait un polymère.

Pour nous en tenir aux seuls faits accessibles à l'expéri-

mentation et révélés par elle, la formation préliminaire et constamment observée d'un aldéhyde autre que l'acroléine, et possédant les caractères de l'aldéhyde hydracrylique, doit suffire à nous faire comprendre le mécanisme du phénomène dans ce qu'il a d'essentiel, c'est-à-dire indépendamment de la formation possible de toutes autres combinaisons intermédiaires, et nous autoriser à considérer l'acroléine comme *naissant à l'état libre, par voie biologique, et par déshydratation progressive de la glycérine.*

De plus, alors que dans les actions fermentaires qualifiées comme réversibles et rappelées dans notre introduction, l'ouvrage de la diastase se trouve strictement limité à une hydratation ou à une déshydratation, suivant la nature de la substance qui lui est présentée, maltose ou glucose, dans l'étude de Hill sur la maltase, l'œuvre microbienne déshydratante actuelle paraît être le prélude d'autres transformations et servir d'origine à la formation d'au moins certains des corps résultant de cette dislocation de la glycérine.

Ces caractères distinctifs se complètent mutuellement et répondent bien à la supériorité, par leur diversité opératoire, des agents microbiens sur les réactifs physiques ou chimiques, grâce à la plasticité de leur action protoplasmique qui leur permet de reprendre en sous-œuvre, dès qu'ils leur deviennent utiles ou même nuisibles, les matériaux primitivement élaborés par eux et momentanément mis de côté.

L'introduction dans la Microbiologie de cette notion nouvelle de « *ferment figuré déshydratant, à caractère analytique* » n'a rien d'inconciliable avec les données de la science : bien au contraire, elle contribue encore à resserrer le lien déjà si étroit entre les phénomènes biochimiques et ceux de la chimie pure.

REMARQUE. — L'un des faits de notre étude, rappelé dans le paragraphe précédent, et qui rapproche l'antiseptique de l'aliment, ou du moins qui n'établit entre eux aucune délimitation bien nette, n'est pas exceptionnel ; d'autres auteurs en ont rencontré de semblables dans leurs recherches : l'une de celles que nous allons citer porte précisément sur un corps de même fonction chimique que l'acroléine.

En particulier, l'aldéhyde formique est un antiseptique

très puissant, peut-être même plus actif dans son action coagulante sur le protoplasma que l'aldéhyde acrylique. Ce corps, qui ne peut par conséquent être produit en quantités bien sensibles, peut cependant être consommé par le microbe qui l'a engendré, ainsi que Péré (1) s'en est assuré directement en l'offrant à des cultures prospères de *Tyrophthrix tenuis* : par cet antiseptique, le microbe est atteint ; le voile qu'il forme se disloque et tombe, mais quelques cellules s'acclimatent dans ce nouveau milieu et finissent par redonner un voile pour lequel l'aldéhyde formique est un aliment, car on constate sa disparition progressive.

De même, Sorel a montré, en 1895, qu'il est possible d'effectuer des fermentations alcooliques en présence de formaldéhyde ajouté au liquide fermentescible ; l'aldéhyde disparaît, et d'autant plus facilement que l'on emploie un milieu de culture plus riche en matières azotées complexes. A ce sujet, nous devons faire remarquer que, dans notre étude, nous avons aussi reconnu la disparition plus rapide de l'acroléine dans les cultures en milieu peptoné qu'en milieu purement minéral, ne contenant d'autre azote que de l'azote ammoniacal.

Il est ainsi vraisemblable d'admettre que les aldéhydes formique et acrylique perdent leurs propriétés antiseptiques et deviennent alimentaires dans les milieux de culture où leur présence est le résultat d'une addition ou d'une formation, grâce à la grande facilité de copulation des deux groupements fonctionnels aldéhydique et amidogène : la disparition progressive de l'aldéhyde résulterait alors de la consommation alimentaire d'une combinaison *amidoaldéhyde* par l'être vivant.

Dans le même ordre d'idées, Duclaux (2) a reconnu que l'acide formique, antiseptique très actif, peut être produit par une espèce qui peut souffrir de sa présence, de même qu'il peut être détruit par cette même espèce, lorsqu'elle l'a engendré ou rencontré tout fait dans son liquide nutritif.

De plus, dans les belles recherches de Raulin sur le développement de l'*Aspergillus niger* (3), l'acide tartrique lui-

(1) PÉRÉ. — Mécanisme de la combustion des corps ternaires par un groupe de microbes aérobies. — *Annales de l'Institut Pasteur*, t. 10, p. 417 ; 1896.

(2) DUCLAUX. — Action antiseptique de l'acide formique. — *Annales de l'Institut Pasteur*, t. 6, p. 593 ; 1892.

(3) RAULIN. — Etudes chimiques sur la végétation, — Recherches sur le développement d'une Mucédinée dans un milieu artificiel. — *Annales des Sciences naturelles*, 1870.

même joue un double rôle dans le liquide nutritif offert à cette Mucédinée : par sa propriété acide, il intervient comme antiseptique en empêchant le milieu d'être envahi par des bactéries ou autres productions parasites, et favorise ainsi le développement de la moisissure qui se trouve lui-même annihilé par une dose excessive, dans la proportion d'environ 25 pour 100 de cet acide ; par sa composition hydrocarbonée, il sert d'aliment au champignon et supplée le sucre du milieu lorsque celui-ci a été consommé.

Enfin, ajoutons encore que, dans l'étude actuelle, nous avons reconnu à l'acide nitreux, ou plutôt aux nitrites, cette faculté double, antiseptique et alimentaire, à l'égard du *Bacillus amaracrylus*.

En résumé, comme l'acide formique dans les recherches de Duclaux ; comme l'acide tartrique dans celles de Raulin ; comme l'aldéhyde formique dans celles de Péré et de Sorel ; l'aldéhyde acrylique et l'acide nitreux, dans les nôtres, sont antiseptiques ou alimentaires : cette double faculté étant subordonnée à la quantité du corps considéré, au degré d'acclimatation du microbe auquel on le présente et à la valeur nutritive du milieu.

En ce qui concerne cette accoutumance, cette accommodation du bacille avec l'antiseptique, ajoutons que nos recherches contribuent encore à témoigner que l'adaptation est un fait d'ordre général, existant à des degrés divers chez les divers microbes et établissant que leur protoplasma se prête de moins en moins à la coagulation quand ils ont été habitués à vivre dans un milieu contenant des doses régulièrement croissantes de substances antiseptiques.

En particulier, nous avons reconnu que le *Bacillus amaracrylus* peut supporter près de deux fois plus d'acroléine après accoutumance que quand il est neuf.

---





## CINQUIÈME PARTIE

---

### Classification du *Bacillus amaracrylus*.

---

De l'étude comparative que nous venons de faire, basée à la fois sur la morphologie, la biologie et la physiologie de ces deux êtres, nous croyons pouvoir conclure que le bacille des vins amers et le bacille des eaux représentent une seule et même espèce, le *Bacillus amaracrylus* ; dénomination qui rappelle sa double fonction pathologique à l'égard du vin, production d'aldéhyde acrylique et de saveur amère : le microbe des eaux constituant l'espèce type ; celui des vins amers pouvant être considéré comme cette espèce elle-même, aux qualités héréditaires simplement modifiées par l'adaptation nécessaire avec son nouvel habitat, ou, pour le moins, comme une variété.

Qu'elle vienne d'un vin amer ou de l'eau, cette bactérie agissant sur un sucre est capable d'engendrer de l'acide lactique en quantité souvent notable, atteignant parfois jusqu'à 35 pour 100 de la substance fermentescible. L'acide lactique représente généralement un terme stable dans la série des dégradations que peut subir une molécule organique complexe en se détruisant sous l'action d'un ferment ; c'est pourquoi, dans ce qui précède, nous avons eu tendance à qualifier les deux variétés de ce bacille comme *ferments lactiques*. Mais nous estimons qu'il ne doit pas être considéré comme un ferment lactique *crâi*, en raison des proportions d'acide lactique produites, encore insuffisantes pour lui valoir ce titre, bien que parfois relativement élevées.

Le caractère fondamental du *Bacillus amaracrylus*, qui doit servir de base à sa classification, est son *pouvoir déshydratant* qu'il exerce à l'égard de la glycérine en produisant la fermentation *acrylique* de cette substance.

Une telle faculté de soustraction d'eau par *voie fermentaire analytique*, jusqu'ici et au moins à notre connaissance, n'a pas encore été démontrée. Il est logique de penser

qu'elle n'appartient pas exclusivement à l'être dont nous venons de faire l'étude.

En conséquence, nous nous croyons autorisé à considérer le *Bacillus amaracrylus* comme un *prototype* dans une catégorie d'êtres microbiens qui seraient, eux-mêmes, capables de produire la *fermentation analytique par déshydratation*.

---

## CONCLUSIONS GÉNÉRALES

---

En résumé, voici les principaux résultats de ce travail et les conclusions générales auxquelles il nous a conduit.

1° Au début de cette étude, nous avons fait connaître une nouvelle réaction colorée de l'acroléine, très sensible, et permettant de caractériser cette substance parmi le groupe des aldéhydes. Cette reconnaissance de l'acroléine est fondée sur l'emploi du réactif *protéique acide*, de préparation facile, et qui constitue un réactif de coloration des corps à fonction aldéhydique. C'est la manifestation de cette réaction à l'égard de l'acroléine, dans des circonstances tout à fait fortuites, qui a été la cause déterminante de notre travail, en nous permettant tout d'abord de reconnaître la formation de l'aldéhyde acrylique au cours de la maladie de l'amertume des vins, et plus généralement ensuite dans la fermentation de la glycérine sous l'action du microbe provoquant cette altération, ou de celui que nous avons isolé des eaux.

Par voie indirecte, la même réaction peut servir à identifier exactement et rapidement d'autres corps dont cet aldéhyde est le dérivé immédiat ou secondaire, comme l'alcool allylique, la glycérine, les graisses et les glycérides en général, même lorsque ces corps sont en minime quantité.

2° Tous les vins atteints de la maladie de l'amertume proprement dite, c'est-à-dire de celle qui succède au développement dans ces liquides de la bactérie découverte et magistralement décrite par Pasteur, sont le siège d'une fermentation déshydratante de la glycérine avec formation d'acroléine.

De ces vins, on peut isoler un bacille possédant les caractères morphologiques de celui observé par l'illustre savant,

capable de transformer, en milieu artificiel, la glycérine en acroléine, et de reproduire par ensemencement dans un vin sain, la maladie avec ses caractères organoleptiques, chimiques et microscopiques. Tous les échantillons de vin dont la composition est favorable à la multiplication de cet être, renferment de l'aldéhyde acrylique ; les acidités volatile et fixe sont augmentées ; la matière colorante est en partie altérée et précipitée, et tous acquièrent à la longue une saveur amère plus ou moins prononcée.

Ce microbe est la cause de la maladie : c'est le *ferment de l'amer*. L'aldéhyde acrylique qui résulte de son action sur la glycérine, subit secondairement des métamorphoses variées, par hydrogénation, oxydation, résinification, polymérisation et acétalisation, conduisant à la formation de produits divers, dont certains, en particulier ceux de nature résineuse, possèdent une saveur amère très accentuée. Nous ne faisons qu'indiquer ici ces transformations aldéhydiques si importantes à considérer dans la recherche de l'origine du goût amer, sur lesquelles nous avons déjà enregistré divers résultats, et dont l'étude sera complétée dans la publication d'un prochain travail, annexe de celui-ci, et portant sur la maladie de l'amertume des vins en général.

Mais, dès à présent, nous pouvons affirmer que la *fermentation acrylique de la glycérine* est au moins l'un des *procès essentiels* que subit le vin quand il tourne à l'amer, et que ses *produits immédiats ou secondaires* suffisent à expliquer les phénomènes d'observation directe au cours de la maladie, notamment la production du goût amer qui en constitue le caractère le plus saillant.

3° L'acroléine naît dès le début de la transformation de la glycérine par ce bacille. Cependant, son apparition dans le vase à fermentation est toujours précédée de la formation d'un autre aldéhyde, qualifié par nous comme étant le *propional* 1.3 ou aldéhyde hydracrylique, qui dérive de la glycérine par soustraction d'une seule molécule d'eau et qui conduit lui-même facilement, au moins par voie physico-chimique à l'aldéhyde acrylique, grâce à une nouvelle déshydratation équivalente à la première : ces deux aldéhydes sont d'ailleurs en relation étroite, chacun d'eux pouvant engendrer l'autre par les procédés inverses d'hydratation et de déshydratation.

La prédominance de l'un ou l'autre de ces aldéhydes dans le liquide de culture est intimement liée à l'activité déshydratante du ferment : selon que celle-ci est *minima* ou *maxima*, le réactif *protéique acide* accuse la présence du *propanolal* ou de l'*acroléine*.

Comme l'aldéhyde hydraacrylique, l'acroléine se transforme au fur et à mesure de sa production et ses métamorphoses sont d'origine chimique et biologique. En milieu de culture non maintenu neutre, la formation de l'aldéhyde acrylique s'arrête en même temps que la fermentation, lorsque l'acidité se trouve en excès : elle réapparaît immédiatement, s'il reste encore de la glycérine à transformer, dès qu'on sature le liquide de carbonate de calcium.

Ce mode de déshydratation biologique de la glycérine en deux phases successives, confirme l'explication que l'on donne du même phénomène dû à l'action sur cette substance des réactifs chimiques déshydratants.

La formation et la destruction continues des deux aldéhydes au cours de la fermentation, assurent à l'action déshydratante un rôle fondamental prépondérant dans cette simplification moléculaire de la glycérine et justifient une fois de plus la disparition déjà fréquemment observée des corps à fonction aldéhydique sous l'influence d'actions biologiques.

4° Ce ferment, végétant dans les vins amers, transformant la glycérine en acroléine, et que, pour ces raisons d'habitat, de fonction physiologique à l'égard de la glycérine et pathologique à l'égard du vin, nous avons dénommé *Bacillus amaracrylus*, fait fermenter les sucres et d'autres alcools polyatomiques, notamment la mannite, mais ne transforme pas sensiblement la dulcité et l'érythrite : il n'agit que modérément sur la dextrine et reste inactif vis-à-vis de l'amidon.

A part les aldéhydes hydraacrylique et acrylique, ainsi que leurs dérivés par hydrogénation, comme le glycol triméthylénique ; par polymérisation, acétalisation, résinification, ou décomposition par l'eau avec oxydation, comme l'acide acrylique, fournis par la glycérine, les produits de ces fermentations sont les suivants : mélange gazeux constitué par de l'hydrogène en proportion dominante et de l'acide carbonique ; alcool éthylique ; acides volatils, formique et surtout acétique, une petite quantité d'acide volatil très peu



soluble dans l'eau, fusible vers 15°, qui est vraisemblablement de l'acide caprylique ; enfin, des acides fixes, lactique et succinique.

Le *Bacillus amaracrylus* ne consomme pas la crème de tartre.

5° L'action décomposante exercée par l'eau sur l'acroléine surtout lorsque celle-ci se trouve à l'état naissant, décomposition vraisemblablement accélérée aussi par l'influence physiologique, avec production des acides acrylique, formique et acétique, explique la présence de ces trois acides dans le liquide de fermentation : l'instabilité des deux premiers et notamment la décomposition par notre bacille, de l'acide formique en ses constituants gazeux, rendent compte, suffisamment, de leur infériorité quantitative vis-à-vis de l'acide acétique dans les résultats analytiques.

La relation d'alcool à aldéhyde qui existe entre le glycol propylénique normal et le propanolal 1.3 nous a conduit à envisager la formation de cet alcool suivant le mode classique, par hydrogénation de son aldéhyde, en raison de l'hydrogène naissant abondamment dégagé au cours de la fermentation.

L'ensemble des faits biochimiques observés dans la transformation de la glycérine, joints à d'autres purement chimiques, antérieurement acquis, permettent de concevoir la production des phénomènes directeurs de cette fermentation à l'aide de réactions successives de *soustraction* et de *fixation des éléments de l'eau*.

6° Il existe dans les eaux une bactérie présentant les caractères morphologiques et cultureux du *Bacillus amaracrylus*, et capable, elle aussi, de déshydrater la glycérine.

Comme le bacille des vins amers, ce microbe isolé des eaux fait fermenter les sucres et les alcools polyatomiques, notamment la glycérine et la mannite ; mais il respecte à peu près intégralement, au moins dans nos conditions opératoires, l'érythrite et la dulcité : il n'agit que faiblement sur la dextrine et demeure inactif vis-à-vis de l'amidon.

Les résultats de l'analyse qualitative et quantitative de notre étude comparative sur la détermination de la fonction physiologique des deux bacilles à l'égard de chacune des substances fermentescibles tendent à l'identification de ces deux êtres.



Les caractères les plus saillants de leur ressemblance absolue, nous autorisant à conclure à leur identité d'espèce, résident à la fois dans la *morphologie*, la *biologie*, la *physiologie* de ces deux bacilles : en particulier, nous les trouvons dans leur commune faculté de *déshydratation de la glycérine*, et dans le pouvoir du bacille des eaux de *provoquer la maladie de l'amertume* avec ses caractères organoleptiques, chimiques et microscopiques, lorsqu'on l'ensemence dans un milieu vineux de composition favorable à son développement.

5° Ce microbe des eaux et le *Bacillus amaracrylus* des vins amers, qui, d'après notre étude, peut être considéré, sinon comme l'espèce type du premier, au moins comme une variété aux qualités héréditaires simplement modifiées par l'adaptation nécessaire avec son milieu nutritif, présentent certains caractères d'analogie et aussi de différence avec le *Bacillus coli communis*, les bacilles *typhique* et *paratyphiques*, que l'on peut rencontrer dans ce même milieu d'origine constitué par les eaux.

Ils se distinguent notamment par l'absence chez ces derniers de la propriété déshydratante à l'égard de la glycérine et du pouvoir pathogène chez les premiers.

Les microbes que nous venons d'étudier apparaissent comme de purs saprophytes : mais la virulence est une propriété essentiellement contingente, ne se manifestant que dans des conditions déterminées, pouvant faire complètement défaut à d'autres moments et suivant les circonstances. D'ailleurs, dans cette appréciation, il convient aussi de se souvenir qu'en milieu glycérimé, ces espèces, que nous considérons comme saprophytes, engendrent néanmoins un produit nuisible, l'aeroléine, corps véritablement toxique, dont la présence dans les vins amers et dans les alcools qui en proviennent rend leur consommation nocive.

Ce bacille des eaux étant suffisamment résistant pour croître en bouillon phéniqué et à température relativement élevée se rencontre fréquemment au cours d'une analyse d'eau, lorsqu'on applique la méthode usuelle de séparation bactérienne fondée sur cette propriété, à la recherche des microbes pathogènes dont la résistance est analogue, et notamment du *Colibacille*. Lorsque cette recherche spéciale aura mis en évidence un microbe possédant les caractères

généraux de ce dernier, mais *non* générateur d'indol, ce microbe sera fréquemment le *Bacillus amaracrylus*, et la *glycéro-réaction* interviendra utilement pour en achever la reconnaissance.

La *glycéro-réaction* peut se manifester lorsqu'on abandonne, en culture spontanée, de l'eau, même potable, simplement glycinée, grâce au pouvoir alimentaire dévolu aux nitrates et aux matières organiques toujours présents dans ce liquide. L'observation analytique de telles cultures montre le pouvoir *dénitrifiant* de ce microbe de l'eau, et sa faculté d'utilisation de l'azote présenté sous la forme d'acide nitreux, les nitrites pouvant jouer à son égard le double rôle de substances antiseptiques ou alimentaires.

8° Pour la discussion de nos résultats, nous avons eu besoin de connaître le signe et la valeur thermochimiques de la réaction classique de déshydratation de la glycérine conduisant à la production de l'acroléine.

Dans ce but, nous avons dû déterminer la chaleur de formation de cet aldéhyde, sur laquelle aucune donnée n'avait été publiée, au moins à notre connaissance, probablement en raison des difficultés opératoires inhérentes à la préparation à l'état pur, et à la conservation pendant le temps minimum nécessaire à l'expérience, d'un corps aussi irritant et aussi altérable. Parallèlement, nous avons fait connaître la chaleur de formation de son polymère, la métacroléine.

Ces déterminations thermochimiques ont établi que la dégradation de la glycérine en acroléine est légèrement exothermique. Elles ont encore mis en évidence la réserve d'énergie accumulée dans le premier terme de la série aldéhydrique  $C^nH^{2n-2}O$ , et se manifestant dans le phénomène de polymérisation, conformément à un principe général admis par Berthelot.

9° Théoriquement, ces recherches introduisent dans la Microbiologie la notion nouvelle d'une action fermentaire due à un *ferment figuré*, s'accomplissant par *voie de déshydratation* et conduisant à la formation d'un produit d'*analyse*.

La connaissance de ce fait permet de concevoir le *Bacillus amaracrylus* comme le *prototype* d'une catégorie de microbes qui seraient, eux-mêmes, capables de produire la *fermentation analytique par déshydratation*.

10° Théoriquement et pratiquement, cette étude accroît le champ de nos connaissances sur la maladie de l'amertume des vins, si funeste aux grands crus, notamment ceux de la Bourgogne. En particulier, elle certifie la préférence marquée du ferment de l'*amer* pour la glycérine, fait déjà entrevu par Pasteur dans son admirable travail sur cette maladie.

Bien plus, et s'il en était besoin, elle suffirait à protéger cette partie de l'œuvre du grand Maître de la Science française contre les idées émises par le savant allemand Wortmann, qui, après avoir réfuté sans preuves l'opinion de Pasteur, attribue la cause de la maladie, *hypothétiquement* d'ailleurs, à l'action de champignons divers dont les diastases oxydantes attaqueraient les matières tanniques et colorantes en les transformant en substances amères. Mais le développement de cette critique sera mieux à sa place dans notre travail sur la maladie de l'amertume des vins.

L'identification du *Bacillus amaracrylus*, végétant dans les vins amers, avec le bacille, hôte banal des eaux, que nous venons d'étudier, nous montre comment l'introduction de l'eau dans le vin, qui pratiquement ne peut être évitée, soit pendant la vinification, soit au moment de la mise en bouteille, doit apporter le germe de la maladie.

D'ailleurs, cette conception n'est-elle pas logique ? Les microbes ne naissent pas spontanément ; lorsqu'on les rencontre, il faut rechercher leur origine dans les éléments qui nous entourent : le sol, l'air et l'eau, habitats naturels de la vie microbienne. Le sol, en particulier, ce grand réservoir duquel tout part et auquel tout revient, aussi bien dans le règne minéral que dans le monde vivant, animal ou végétal, doit être le lieu d'origine de ce ferment de l'amertume que l'on retrouve par suite dans les eaux et dans l'atmosphère.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 27 septembre 1917.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

PAUL APPELL.

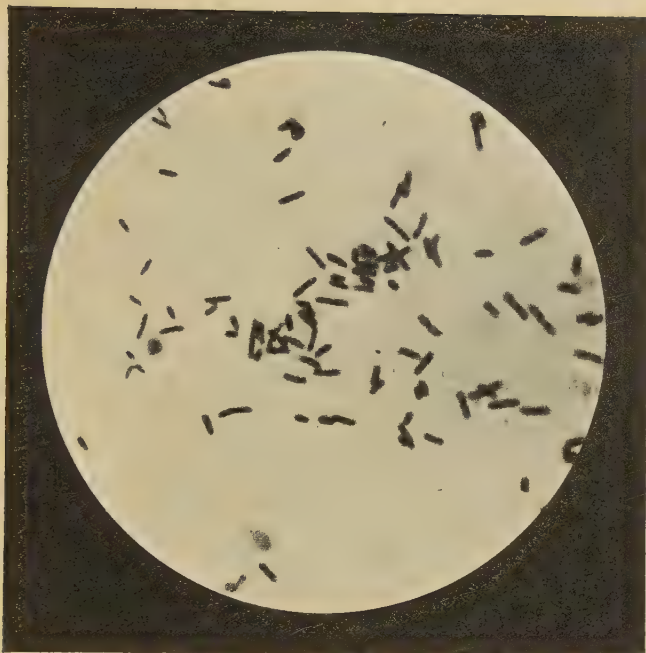
VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris.

POUR LE VICE-RECTEUR :

L'Inspecteur de l'Académie délégué :

ISTRIA.



*Bacillus amarae crylus.* (Gr.: 1875/1.)



Bacille des eaux. (Gr.: 1875/1.)





# TABLE DES MATIÈRES

|                                                      | PAGES |
|------------------------------------------------------|-------|
| PRÉFACE.....                                         | I     |
| INTRODUCTION.....                                    | 1     |
| <i>Synthèse biochimique par déshydratation</i> ..... | 2     |
| <i>Analyse biochimique par déshydratation</i> .....  | 6     |

## PREMIÈRE PARTIE

|                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Etude d'un ferment végétant dans les vins amers, le</b><br><i>Bacillus amaracrylus</i> , <b>agent de déshydratation de la</b><br><b>Glycérine</b> ..... | 11 |
| Nouvelle réaction colorée de l'acroléine.....                                                                                                              | 11 |
| Formation d'acroléine dans la maladie de l'amertume des vins.....                                                                                          | 13 |
| Origine et isolement du bacille.....                                                                                                                       | 17 |
| <i>Caractères généraux du Bacillus amaracrylus</i> .....                                                                                                   | 19 |
| <b>A. — MORPHOLOGIE ET BIOLOGIE GÉNÉRALE</b> .....                                                                                                         | 19 |
| Formes. — Dimensions. — Coloration.....                                                                                                                    | 19 |
| Motilité. — Reproduction.....                                                                                                                              | 21 |
| Aérobiose ou Anaérobiose.....                                                                                                                              | 23 |
| Vitalité.....                                                                                                                                              | 26 |
| Virulence. — Réaction à l'égard des sérums. — Agglutination.....                                                                                           | 29 |
| <b>B. — CARACTÈRES DES CULTURES DANS LES MILIEUX USUELS</b> .....                                                                                          | 29 |
| I. — <i>Milieux artificiels</i> .....                                                                                                                      | 29 |
| a) Liquides :                                                                                                                                              |    |
| 1° Milieux d'origine organique de nature animale.....                                                                                                      | 29 |
| Bouillon ordinaire. — Bouillon phéniqué.....                                                                                                               | 30 |
| 2° Milieux d'origine organique de nature végétale.....                                                                                                     | 30 |
| 3° Milieux d'origine minérale.....                                                                                                                         | 30 |
| b) Solides :                                                                                                                                               |    |
| 1° Milieux d'origine organique de nature animale.....                                                                                                      | 31 |
| Gélatine peptone. — Gélose peptone. — Gélatine ou                                                                                                          |    |
| gélose glycinée.....                                                                                                                                       | 32 |
| 2° Milieux métalliques.....                                                                                                                                | 32 |
| II. — <i>Milieux naturels</i> .....                                                                                                                        | 33 |
| a) De nature animale :                                                                                                                                     |    |
| Lait. — Sérum solidifié.....                                                                                                                               | 33 |
| b) De nature végétale :                                                                                                                                    |    |
| Vin. — Pomme de terre. — Pomme de terre glycinée.....                                                                                                      | 33 |
| III. — <i>Cultures dans les milieux colorés</i> .....                                                                                                      | 33 |
| Tournesol. — Rouge neutre. — Rosaniline.....                                                                                                               | 33 |

|                                                                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| C. — CARACTÈRES BIOCHIMIQUES .....                                                                                       | 33  |
| I. — <i>Action sur les matières azotées.</i> .....                                                                       | 33  |
| 1 <sup>o</sup> Albuminoïdes : Recherche de l'indol et de l'ammoniaque. .                                                 | 34  |
| 2 <sup>o</sup> Nitrates : Recherche des nitrites et de l'azote. — Estima-<br>tion du pouvoir dénitrifiant .....          | 36  |
| 3 <sup>o</sup> Urée .....                                                                                                | 37  |
| II. — <i>Action sur les alcools polyatomiques et les hydrates de<br/>      carbone</i> .....                             | 37  |
| III. — <i>Action sur certains sels organiques</i> .....                                                                  | 38  |
| <b>Fermentation de la Glycérine</b> .....                                                                                | 40  |
| Expérience préliminaire. ....                                                                                            | 40  |
| <i>Fermentation de la Glycérine en milieu peptoné acide</i> .....                                                        | 43  |
| Analyse des gaz .....                                                                                                    | 44  |
| Etude de l'acidité .....                                                                                                 | 46  |
| Analyse qualitative des acides volatils .....                                                                            | 48  |
| — quantitative des acides volatils .....                                                                                 | 51  |
| — qualitative des acides fixes .....                                                                                     | 56  |
| — quantitative des acides fixes .....                                                                                    | 63  |
| — qualitative et quantitative de l'alcool éthylique. .                                                                   | 66  |
| Recherche d'alcools à point d'ébullition élevé .....                                                                     | 74  |
| Recherche, dosage et variations de l'acroléine .....                                                                     | 74  |
| <i>Fermentation de la Glycérine en milieu minéral acide</i> .....                                                        | 77  |
| Analyse des gaz. — Analyse du liquide .....                                                                              | 77  |
| Recherche, dosage et variations de l'acroléine .....                                                                     | 81  |
| Comparaison et discussion des résultats de fermentation de<br>la Glycérine en milieu acide, peptoné ou purement minéral. | 83  |
| <i>Fermentation de la Glycérine en milieu minéral neutre</i> .....                                                       | 83  |
| Analyse des gaz .....                                                                                                    | 84  |
| Acidité volatile insoluble. Recherche de l'acide caprylique ...                                                          | 89  |
| Acidité volatile soluble .....                                                                                           | 91  |
| Acidité fixe. Analyse quantitative des acides fixes .....                                                                | 93  |
| Analyse quantitative d'un mélange d'acides, lactique, succi-<br>nique, et oxalique .....                                 | 98  |
| Recherche et dosage des alcools .....                                                                                    | 100 |
| Dosage du glycol triméthylénique .....                                                                                   | 102 |
| Recherche, dosage et variations de l'acroléine .....                                                                     | 102 |
| Comparaison et discussion des résultats de fermentation de<br>la Glycérine en milieu acide et en milieu neutre .....     | 106 |
| Formules chimiques de la production des différents corps<br>dans la fermentation de la Glycérine .....                   | 107 |
| Essai d'une Synthèse de l'action totale .....                                                                            | 112 |
| <b>Fermentation de la Mannite</b> .....                                                                                  | 115 |
| Formules chimiques de la production des différents corps<br>dans la fermentation de la Mannite .....                     | 123 |
| <i>Essais de fermentation d'autres alcools polyatomiques</i> .....                                                       | 126 |
| <b>Fermentation des Hydrates de carbone</b> .....                                                                        | 127 |
| <i>Fermentation du Glucose</i> .....                                                                                     | 128 |

|                                                                                                                           | PAGES |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <i>Fermentation du Léculose</i> .....                                                                                     | 134   |
| <i>Fermentation du Galactose</i> .....                                                                                    | 141   |
| Formules chimiques de la production des différents corps<br>dans la fermentation des Hexoses .....                        | 147   |
| <i>Fermentation du Saccharose</i> .....                                                                                   | 151   |
| <i>Fermentation du Lactose</i> .....                                                                                      | 157   |
| <i>Fermentation du Maltose</i> .....                                                                                      | 163   |
| Formules chimiques de la production des différents corps<br>dans la fermentation des Saccharoses .....                    | 170   |
| Tableau comparatif des résultats de fermentation de la Gly-<br>cérine, de la Mannite, des Hexoses et des Saccharoses .... | 173   |
| Comparaison et discussion des résultats .....                                                                             | 173   |
| ESSAI DE REPRODUCTION DE LA MALADIE DE L'AMERTUME DES VINS.                                                               | 175   |

## DEUXIÈME PARTIE

|                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Sur un ferment contenu dans les eaux, capable de<br>déshydrater la Glycérine ..... | 177 |
| <i>Caractères généraux du ferment</i> .....                                        | 188 |
| MORPHOLOGIE ET BIOLOGIE GÉNÉRALE .....                                             | 189 |
| CARACTÈRES BIOCHIMIQUES .....                                                      | 189 |
| Production de glycol triméthylénique .....                                         | 190 |
| Conséquences de la formation du glycol tri-réthylénique .....                      | 192 |

## TROISIÈME PARTIE

|                                                                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Etude comparative du bacille isolé de l'eau avec le<br/><i>Bacillus amaraerylus</i> retiré d'un vin amer et avec<br/>d'autres microbes contenus dans les eaux</b> ..... | 197 |
| <i>Fermentation de la Glycérine</i> .....                                                                                                                                  | 198 |
| Dosage du glycol triméthylénique .....                                                                                                                                     | 202 |
| <i>Fermentation de la Mannite</i> .....                                                                                                                                    | 205 |
| <i>Fermentation du Glucose</i> .....                                                                                                                                       | 209 |
| <i>Fermentation du Saccharose</i> .....                                                                                                                                    | 213 |
| Tableau comparatif des résultats de fermentation obtenus<br>avec la Glycérine, la Mannite, le Glucose et le Saccharose.                                                    | 217 |
| Comparaison des résultats de fermentation obtenus avec le<br>bacille de l'amertume des vins et celui retiré des eaux .....                                                 | 217 |
| ESSAI DE REPRODUCTION DE LA MALADIE DE L'AMERTUME DES VINS.                                                                                                                | 222 |
| <b>Comparaison entre ce bacille et d'autres microbes des<br/>eaux</b> .....                                                                                                | 227 |
| A. — MORPHOLOGIE ET BIOLOGIE GÉNÉRALE .....                                                                                                                                | 227 |
| Formes. — Dimensions. — Coloration. — Motilité .....                                                                                                                       | 227 |
| Reproduction. — Aérobiose ou Anaérobiose. — Vitalité .....                                                                                                                 | 229 |
| Virulence. — Réaction à l'égard des sérums. — Agglutination.                                                                                                               | 231 |
| B. — CARACTÈRES DES CULTURES DANS LES MILIEUX USUELS .....                                                                                                                 | 232 |
| Gélatine. — Géluse. — Pomme de terre .....                                                                                                                                 | 232 |
| Bouillon ordinaire. — Bouillon phéniqué. — Lait .....                                                                                                                      | 233 |
| <i>Cultures dans les milieux colorés</i> .....                                                                                                                             | 233 |
| Tournesol. — Rouge neutre. — Rosaniline .....                                                                                                                              | 233 |

|                                                                                                                                                                                                                                 | PAGEs |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <i>Cultures dans les milieux métalliques</i> .....                                                                                                                                                                              | 234   |
| C. — CARACTÈRES BIOCHIMIQUES.....                                                                                                                                                                                               | 234   |
| I. — <i>Action sur les matières azotées</i> .....                                                                                                                                                                               | 234   |
| 1 <sup>o</sup> Albuminoïdes : Recherche de l'indol et de l'ammoniaque.                                                                                                                                                          | 234   |
| 2 <sup>o</sup> Nitrates : Recherche des nitrites et de l'azote. — Esti-<br>mation du pouvoir dénitrifiant.....                                                                                                                  | 235   |
| 3 <sup>o</sup> Urée.....                                                                                                                                                                                                        | 235   |
| II. — <i>Action sur les alcools polyatomiques et les hydrates de</i><br><i>carbone</i> .....                                                                                                                                    | 236   |
| Essai de classification de ce bacille .....                                                                                                                                                                                     | 238   |
| Application à l'Analyse des eaux.....                                                                                                                                                                                           | 239   |
| <b>Glycéro-réaction</b> .....                                                                                                                                                                                                   | 241   |
| L'eau potable glycinée peut donner la <i>glycéro réaction</i> ...                                                                                                                                                               | 259   |
| Le <i>Bacillus amaracrylus</i> consomme l'azote nitreux .....                                                                                                                                                                   | 263   |
| Tableau comparatif des caractères principaux du <i>Bacillus</i><br><i>amaracrylus</i> d'un vin amer, du <i>Bacille</i> retiré de l'eau, du<br><i>Colibacille</i> et des bacilles <i>Typhique</i> et <i>Paratyphiques</i> A et B | 264   |

#### QUATRIÈME PARTIE

|                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Recherches complémentaires sur la fermentation de la</b><br><b>Glycérine par le bacille des vins amers et par le</b><br><b>bacille des eaux</b> .....                                                                                      | 267 |
| I. — <i>Signe et valeur thermochimiques de la transformation</i><br><i>de la glycérine en acroléine</i> .....                                                                                                                                 | 268 |
| Chaleurs de formation de l'Acroléine et de la Métacroléine...                                                                                                                                                                                 | 269 |
| II. — <i>L'acroléine engendrée par cette action biochimique</i><br><i>résulte bien de la déshydratation de la glycérine</i> .....                                                                                                             | 272 |
| III. — <i>Ce phénomène de déshydratation est-il produit par l'être</i><br><i>vivant ou par une diastase, et cette action cellulaire ou</i><br><i>diastasique est-elle réversible ?</i> .....                                                  | 275 |
| Recherche d'une diastase de déshydratation .....                                                                                                                                                                                              | 279 |
| IV. — <i>La dégradation progressive de la glycérine en aldéhydes</i><br><i>hydracrylique et acrylique constitue-t-elle une action</i><br><i>primordiale dont dépend la genèse des autres produits de</i><br><i>cette fermentation ?</i> ..... | 280 |
| V. — <i>Essai d'interprétation de cette action fermentaire et</i><br><i>comparaison avec celles antérieurement connues, s'accom-</i><br><i>plissant par déshydratation</i> .....                                                              | 284 |

#### CINQUIÈME PARTIE

|                                                            |     |
|------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Classification du <i>Bacillus amaracrylus</i></b> ..... | 293 |
| <b>CONCLUSIONS GÉNÉRALES</b> .....                         | 294 |



# SECONDE THÈSE

---

## PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Application des Méthodes physiques à la Détermination  
des Masses moléculaires.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 27 septembre 1917.

*Le Doyen de la Faculté des Sciences,*

PAUL APPELL.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

*Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris.*

POUR LE VICE-RECTEUR :

*L'Inspecteur de l'Académie délégué,*

ISTRIA.











